

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Inneren Medizin – Zentrallabor
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. W. Caspary

POINT-OF-CARE DIAGNOSTIK
ROUTINEUNTERSUCHUNG AM KRANKENBETT
VERGLEICH MIT NASSCHEMISCHEN VERFAHREN

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs
Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am
Main

vorgelegt von
Ingeborg Angela Bretschneider
aus Immenstadt im Allgäu
Frankfurt am Main 2004

Gliederung:

1 Einleitung.....	4
2 Theoretische Grundlagen.....	7
2.1 HbA _{1c} - Glykiertes Hämoglobin als Langzeitparameter bei Diabetes mellitus .	7
2.1.1 Einführung.....	7
2.1.2 Glykierte Serumproteine und Hämoglobine.....	8
2.1.3 Einteilung der Glykohämoglobine.....	10
2.1.4 Entstehung des HbA _{1c}	11
2.1.5 Klinische Aussagekraft des HbA _{1c}	12
2.1.6 Ausgewählte Nachweismethoden.....	14
2.1.7 Störfaktoren und Interferenzen.....	16
2.2 C-reaktives Protein – ein Entzündungsmarker.....	20
2.2.1 Einführung.....	20
2.2.2 Bildung des C-reaktiven Proteins.....	21
2.2.3 Funktion des CRP.....	22
2.2.4 CRP und andere Entzündungsparameter.....	23
2.2.5 Klinische Aussagekraft des CRP.....	25
2.2.6 Ausgewählte Nachweismethoden.....	28
2.2.7 Störfaktoren und Interferenzen.....	32
2.3 D-Dimere.....	33
2.3.1 Entstehung der D-Dimere.....	33
2.3.2 Klinische Aussagekraft.....	35
2.3.3 Ausgewählte Nachweismethoden.....	37
2.3.4 Störfaktoren und Interferenzen.....	38
3 Material und Methoden.....	39
3.1 Probenmaterial.....	39
3.2 Bestimmungsmethoden.....	40
3.2.1 HbA _{1c} Diagnostikgeräte.....	41
3.2.1.1 NycoCard® HbA _{1c}	41
3.2.1.2 Variant II.....	43
3.2.2 CRP Diagnostikgeräte.....	44
3.2.2.1 NycoCard® CRP Whole Blood.....	44

3.2.2.2 Micros CRP	47
3.2.2.3 Tina-quant® CRP /Hitachi 917	49
3.2.3 D-Dimer-Diagnostikgeräte	50
3.2.3.1 NycoCard® D-Dimer	50
3.2.3.2 Turbiquant® D-Dimer	52
3.2.3.3 Mini VIDAS®	54
3.3 Versuchsdurchführung	55
3.3.1 HbA _{1c} - Messung	56
3.3.2 CRP – Messung	56
3.3.3 D-Dimer Messung	57
3.4 Statistische Methoden	58
3.5 Graphische Darstellung	59
4 Ergebnisse	60
4.1 HbA _{1c} Messergebnisse	60
4.1.1 NycoCard® HbA _{1c}	60
4.2 CRP Messergebnisse	63
4.2.1 NycoCard® CRP	63
4.2.2 Micros® CRP	66
4.3 D-Dimer Messergebnisse	69
4.3.1 NycoCard® D-Dimer	69
4.3.2 Turbiquant® D-Dimer	72
5 Diskussion	76
5.1 Point-of-Care Diagnostik	76
5.2 HbA _{1c} Messgeräte	78
5.3 CRP Messgeräte	84
5.4 D-Dimer Messgeräte	89
6 Zusammenfassung	95
7 Literaturverzeichnis	99
8 Anhang	112
8.1 Lebenslauf	112
8.2 Danksagung	114
8.3 Schriftliche Erklärung	115

1 Einleitung

Viele chronische Erkrankungen bedürfen einer regelmäßigen, genauen und oft auch lebenslangen Überwachung der Blut- und Urinwerte des Patienten. Für die Betroffenen bedeutete dieses ursprünglich häufige Arztbesuche zur Blutentnahme und damit verbundene lange Wartezeiten bis zum Erhalt der Laborergebnisse. Dazwischen lagen Zeiträume ohne jegliche objektive Kontrolle über den aktuellen Zustand des Patienten. Eine Eigenkontrolle war oft nicht möglich. Bei chronisch Erkrankten kann diese Situation zu einer gewaltigen Einschränkung ihrer Lebensqualität führen. So wird oftmals der Verlust an Freiheit zur Zeit- und Reiseplanung, sowie eine zusätzliche psychische Belastung durch die Ungewissheit des bevorstehenden Ergebniserhalts beklagt. Dieser Umstand stellt weiterhin ein großes Problem bezüglich von Compliance und Behandlungserfolg dar. Aus diesem Grund versuchte man verschiedene Testverfahren zu vereinfachen und von der Standardlabormethode abzukoppeln.

Bereits im Jahre 1941 entwickelte Miles, heute zur Bayer AG gehörend, im Rahmen des Diabetes Managements den ersten Glucoseteststreifen für Urin. Er erhielt den Produktnamen „Clinitest“ [6]. Seit dieser Entwicklung sind viele verschiedene Messsysteme auf den Markt gekommen, die jedoch nicht allein auf die Messung der Blutzuckerwerte und Gerinnungsparameter beschränkt sind, sondern auch weitere Bereiche der klinischen Diagnostik erfassen. Diese Geräte gewinnen nicht nur bei der Kontrolle und Therapie chronischer Erkrankungen immer mehr an Bedeutung, sondern auch bei Routinemessungen von Standardlaborparametern in der Arztpraxis. Die ständige Neu- und Weiterentwicklung sogenannter Point-of-Care und Critical-Care Messgeräte bringt zahlreiche Vorteile mit sich. So werden Probenentnahme und Messvorgänge soweit vereinfacht, dass Patienten selbst die für sie notwendigen Messungen durchführen und deren Ergebnisse dokumentieren können. Arzt und Patient erhalten somit einen detaillierten Überblick über den Verlauf der zu erfassenden Werte und deren Abhängigkeit von äußeren Einflüssen. Die notwendige Medikamentendosis kann optimal an die jeweiligen Messwerte angepasst werden. Die Gefahr einer Über- oder Unterdosierung von Medikamenten wird minimiert. Die

Möglichkeit Messungen an jedem Ort durchführen zu können reduziert die oft zeitraubenden Arztbesuche auf das unbedingt notwendige Maß. Die Patienten gewinnen somit einen Großteil ihrer Freiheit und Flexibilität zurück. Doch nicht allein dadurch wird die Compliance erhöht, sondern auch durch eine erleichterte Blutprobenentnahme durch einen kleinen Stich in die Fingerbeere, die mit deutlich weniger Schmerzen und Überwindung einhergeht, als eine herkömmliche venöse Blutentnahme. Von besonderer Bedeutung ist die schnelle Ergebnisgewinnung vor allem in der Notfallmedizin. Hier besitzt der Faktor Analysenzeit einen hohen Stellenwert. Schnelle Ergebnisse bringen dem Patienten in der Notaufnahme oder im Notarztwagen entscheidende Vorteile. Eine Studie von Murray et al. zeigte, dass sich durch Point-of-Care-Testing Verfahren die Aufenthaltsdauer von Patienten in der Notaufnahme im Vergleich zu Zentrallaboruntersuchungen von durchschnittlich 4h 22min auf durchschnittlich 3h 28min verringerte [76].

Der Begriff Point-of-Care-Testing steht für Diagnostik am Krankenbett, wobei die notwendige Messung direkt vor Ort vorgenommen wird. Es entfällt der Probentransport z.B. in ein Labor. Geräte, die vor allem in der Intensivmedizin zum Einsatz kommen, werden unter dem Begriff Critical-Care zusammengefasst.

Die zusammengetragenen Argumente lassen den Schluss zu, dass die Point-of-Care Diagnostik in vielerlei Hinsicht der Standardlabordiagnostik überlegen zu sein scheint. Doch stellt sich hier die entscheidende Frage, ob die Genauigkeit und die Sensibilität der modernen, mobilen Testgeräte hinreichend denen der nasschemischen Standardlaborgeräte entsprechen.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung ausgewählter Geräte an Hand verschiedener Messparameter, hinsichtlich ihrer Messgenauigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse in Bezug zur Standardlabormethode.

Mit der Standardlabormethode sollen verglichen werden: auf dem Gebiet der CRP Diagnostik das Micros CRP der Firma ABX DIAGNOSTICS und das NycoCard® CRP in Verbindung mit dem NycoCard® Reader II der Firma PROGEN BIOTECHNIK GMBH; auf dem Gebiet der HbA_{1c} Diagnostik das Gerät NycoCard®

HbA_{1c} in Verbindung mit dem NycoCard[®] Reader II der PROGEN BIOTECHNIK GMBH. Für den Bereich der D-Dimer Bestimmung die Nachweise NycoCard[®] D-Dimer der PROGEN BIOTECHNIK GMBH und Turbiquant[®] D-Dimer von Dade Behring.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 HbA1c- Glykiertes Hämoglobin als Langzeitparameter bei Diabetes mellitus

2.1.1 Einführung

Der Diabetes mellitus (Diabet- von gr. διαβαίνειν = hindurchgehen; lat. mellitus = mit Honig versüßt), früher oft als Zuckerharnruhr bezeichnet, ist eine chronische Stoffwechselkrankheit, die durch erhöhte Blutglucosewerte charakterisiert ist. Er ist die häufigste endokrine Störung überhaupt. Ungeachtet der Ätiologie hat er das gemeinsame Kennzeichen des relativen oder absoluten Insulinmangels [80]. Die Diagnose eines Diabetes mellitus wird bei Vorliegen von Nüchternblutzuckerwerten $> 6,7 \text{ mmol/l}$ oder 2 Stundenwerten im oralen Glucosetoleranztest über 10 mmol/l im venösen bzw. über $11,1 \text{ mmol/l}$ im kapillären Blut gestellt.

Die häufigsten und bekanntesten Formen des Diabetes mellitus sind der Typ-1-Diabetes, bei dem es zur autoimmunologischen oder idiopathischen Betazelldestruktion mit der Folge eines absoluten Insulinmangels kommt, und der Typ-2-Diabetes, der durch eine Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel gekennzeichnet ist. Neben weiteren bekannteren Formen des Diabetes mellitus wie dem MODY-Diabetes und dem Gestationsdiabetes gibt es noch zahlreiche, wesentlich seltenere Ursachen und Formen des Diabetes mellitus wie z.B. genetische Defekte der Insulinwirkung, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Endokrinopathien, medikamentös induziert, etc.. [89].

Eine verspätete, fehlende oder unzureichende Therapie des Diabetes mellitus kann zu schwerwiegenden Komplikationen führen. An erster Stelle stehen hier die Erkrankungen, welche durch diabetische Gefäßschäden verursacht werden. Hierbei wird zwischen unspezifischer Makroangiopathie und diabetesspezifischer Mikroangiopathie unterschieden. Die Makroangiopathie führt frühzeitig zur Arteriosklerose mit ihren typischen Krankheitsbildern der koronaren Herzkrankheit mit der Gefahr von Myokardinfarkten, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und der arteriellen Verschlusskrankheit von Hirnarterien mit der Gefahr ischämischer

Insulte. Die diabetische Mikroangiopathie entsteht durch Glykolysierung von Basalmembranproteinen in der kapillären Strombahn. Infolge dessen kommt es zur diabetischen Nephropathie wie z.B. der Kimmelstiel-Wilson Glomerulosklerose, zur diabetischen Retinopathie, zur diabetischen Neuropathie mit u.a. peripherer sensomotorischer Polyneuropathie und autonomer diabetischer Neuropathie, sowie zum diabetischen Fußsyndrom infolge neuropathisch-ischämischer Schädigung. Neben Makro- und Mikroangiopathien können eine allgemeine Resistenzminderung mit Neigung zu Infektionen, Hypertriglyzeridämie und Fettleber, Coma diabeticum, hypoglykämischer Schock, sowie ein hyporeninämischer Hypoaldosteronismus entstehen [47].

2.1.2 Glykierte Serumproteine und Hämoglobine

Bei einem Diabetes mellitus wird die Therapieeinstellung durch Messung der Blutglucosekonzentration kontrolliert. Jedoch spiegelt dieser Wert nur die momentane Stoffwechsellage wieder und erlaubt keinen Rückschluss auf den mittleren Blutzuckerwert. Um Spätschäden durch dauerhaft erhöhte Glucosewerte zu vermeiden, ist es notwendig diese über einen längeren Zeitraum zu erfassen um häufig auftretende unentdeckte Fluktuationen abschätzen zu können [69]. So wie Glucose sich an die Proteine von Gefäßen und Organstrukturen anlagert, reagiert sie wie auch andere im Blut befindlichen Monosaccharide mit den Aminogruppen der dort zirkulierenden Proteine. Bei den Proteinen kann es sich dabei um Serumproteine oder um Hämoglobin handeln. Die ablaufende Reaktion wird als Glykierung bezeichnet. Sie verläuft nicht-enzymatisch, ist konzentrationsabhängig und irreversibel [98].

Die Gruppe der glykierten Serumproteine werden als Fructosamine zusammengefasst, wobei darunter das glykierte Albumin die größte Fraktion bildet. Die Halbwertszeit der Fructosamine beträgt 14 bis 20 Tage und eignet sich daher zur Abschätzung der Stoffwechsellage der letzten zwei Wochen [90,69].

Es sind Nachweismethoden zur Bestimmung der Fructosaminkonzentration erhältlich, jedoch bestehen hier zahlreiche analytische und interpretatorische Schwierigkeiten, da die verschiedenen Fructosamine unterschiedliche

Konzentrationen und Halbwertszeiten besitzen [98]. Zusätzlich unterliegen sie größeren intraindividuellen Schwankungen und zeigen fehlerhafte Ergebnisse bei pathologischen Albuminkonzentrationen [69]. Sie zeigen darüber hinaus keine so große Korrelation mit der durchschnittlichen Glucosekonzentration wie die Glykohämoglobine [94].

Daher wird diese Untersuchung vor allem vorgenommen, wenn in Einzelfällen die Glykohämoglobinbestimmung kein sicheres Ergebnis liefert oder auch kürzere Kontrollzeiträume wie bei Schwangerschaften nötig sind [90].

Als Langzeitparameter zur Kontrolle der Blutzuckerkonzentration eignen sich wegen ihrer Stabilität besonders die glykierten Hämoglobine. Ihre Halbwertszeit ist im Wesentlichen von der Lebenszeit der Erythrozyten abhängig, die 100 bis 120 Tage beträgt. Die Konzentration der Glykohämoglobine korreliert mit der Dauer und Höhe der Glucosekonzentration der vorangegangenen 6 bis 8 Wochen [98,69].

Die Bestimmung der Glykohämoglobine dient der allgemeinen Therapiekontrolle und im Besonderen der Aufdeckung hyperglykämischer Episoden, die durch intermittierende Blutzuckermessungen nicht erfasst werden. Im Gegensatz dazu kann eine zu streng eingestellte Diabetestherapie durch einen HbA_{1c} Wert im unteren Normbereich aufgezeigt werden [28]. In diesem Fall ist der Blutzucker im Mittel zu niedrig und es steigt die Gefahr hypoglykämischer Komplikationen.

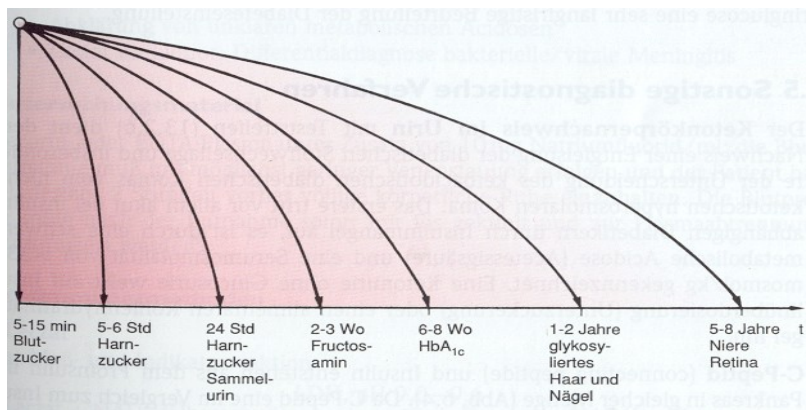


Abb. 2.1: Zeitraster diagnostischer Möglichkeiten bei Hyperglykämie [28]

2.1.3 Einteilung der Glykohämoglobine

Der Begriff Glykohämoglobine umfasst alle Formen von Hämoglobinen, die eine irreversible, nicht-enzymatische Bindung mit Glucose aufweisen. Diese werden je nach Hämoglobinart in weitere Gruppen unterteilt.

Das beim Menschen häufigste und mit 95-97% den größten Anteil bildende ist das Hämoglobin A (HbA), bestehend aus zwei α - und zwei β -Ketten. Als HbA₀ wird die unglykierte Form bezeichnet, wohingegen HbA₁ das glykierte HbA ist. Das HbA₁ wird noch je nach Art der Glykierung weiter unterteilt. Beim HbA_{1a1} ist die β -Kette des HbA mit Fructose-1,6-diphosphat glykiert, beim HbA_{1a2} mit Glucose-6-phosphat. Der Reaktionspartner des HbA_{1b} ist unbekannt. Die Hauptfraktion des HbA₁ bildet mit 75-80% das HbA_{1c}, welches mit D-Glucose am N-terminalen Valin der β -Kette glykiert ist.

Neben den verschiedenen Formen des HbA₁ gibt es auch glykierte Hämoglobine beim HbA₂, das aus zwei α - und zwei δ -Ketten gebildet wird, sowie dem fetalen Hämoglobin HbF, bestehend aus zwei α - und zwei γ -Ketten. Diese Formen haben jedoch nur einen geringen Anteil am Gesamthämoglobin und somit auch an allen Glykohämoglobinen [98].

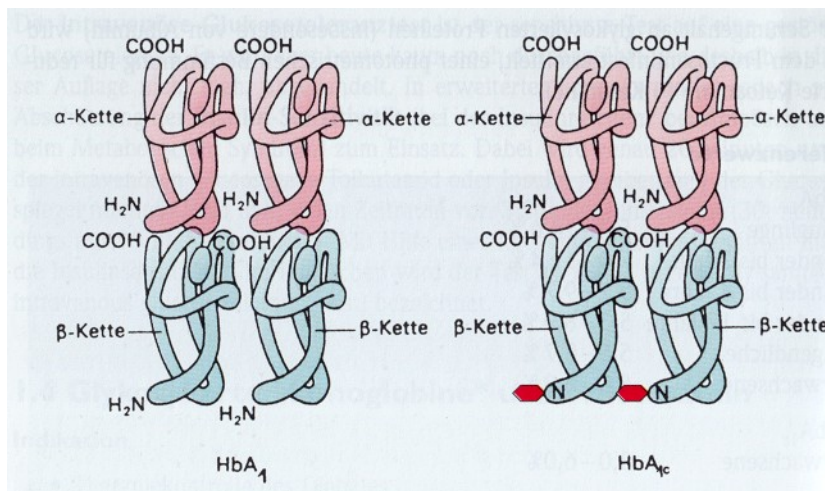


Abb. 2.2: HbA_{1c} [28]

2.1.4 Entstehung des HbA_{1c}

Im ersten Schritt zur Bildung der Glykohämoglobine reagiert die freie Aldehydgruppe der D-Glucose mit einer primären Aminogruppe der Hämoglobine zu einer Schiff'schen Base. Dieses als Aldiminform bezeichnete Zwischenprodukt ist nicht beständig, so dass die Reaktion reversibel ist. Die Anlagerung der Glucose an das Hämoglobin ist pH- und konzentrationsabhängig. Da die erste Aldiminentstehung reversibel ist, wirkt sich eine kurzzeitige Erhöhung der Blutglucosekonzentration nur in geringem Maß auf die Glykohämoglobinmenge aus. Erst durch eine weitere intramolekulare Umlagerung der instabilen Aldiminform in eine stabile Ketoaminform entsteht das stabile Glykohämoglobin. Diese Reaktion wird als Amadori Umlagerung bezeichnet und ist nahezu irreversibel. In weiteren Reaktionen entstehen Maillard-Produkte, auch advanced glycated endproducts genannt.

Die Ketoaminform des Glykohämoglobin ist nicht abbaubar. Daher begrenzt nur die Lebensdauer der Erythrozyten die Dauer des Fortbestehens von Glykohämoglobinen. Beim gesunden Menschen beträgt die mittlere Halbwertszeit der Erythrozyten 60 Tage.

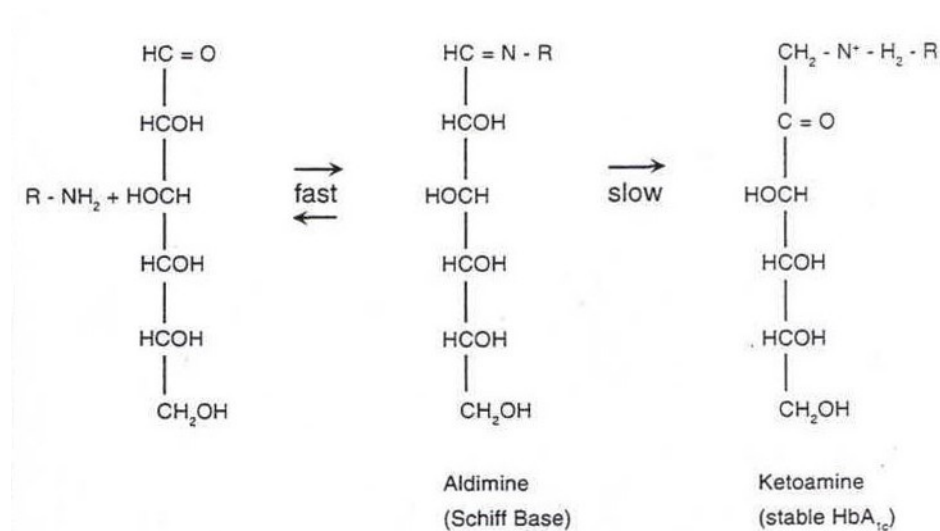


Abb. 2.3: Ablauf der HbA_{1c} Entstehung

2.1.5 Klinische Aussagekraft des HbA_{1c}

Die Bestimmung des HbA_{1c} ist für die Diabeteskontrolle ein wesentliches Kriterium geworden. Patienten mit einem nichtbehandelten Diabetes mellitus weisen einen höheren Glykohämoglobinspiegel als Gesunde auf [75]. So erlaubt der HbA_{1c} - Wert nicht nur einen Schluss auf die durchschnittliche Blutglucosekonzentration der vergangenen Wochen, sondern lässt auch eine Risikoabschätzung der möglichen Folgeschäden zu, mehr als dieses momentane und punktuell ermittelte Blutzuckerwerte können.

Die ermittelten Konzentrationen des Glykohämoglobins korrelieren mit der mittleren Blutglucosekonzentration der vorausgegangenen 6-8 Wochen [90,94]. Die Berechnung der mittleren Blutglucosekonzentration erfolgt nach einem linearen Algorithmus, der jedoch nur für die jeweilige Methode seine Gültigkeit besitzt. So haben Berger und Flückiger zum Beispiel für die Biorad-Minisäulen folgende Formel errechnet:

$$[2,02 \times \text{HbA}_{1c}] - 5,19 = c_{\text{Glucose}} \text{ [mmol/l]} \quad [90]$$

Frühere Autoren gingen davon aus, die HbA_{1c} Konzentration sei nicht vom Alter abhängig, später konnte jedoch aufgezeigt werden, dass mit steigendem Lebensalter auch die Glykohämoglobinkonzentrationen zunehmen. Es ließen sich auch geschlechtsabhängige Unterschiede der HbA_{1c}-Konzentrationen nachweisen. So zeigen Frauen höhere HbA_{1c}-Werte auf als Männer. Als Ursache wird eine größere Menge an fetalem Hämoglobin bei Frauen vermutet [90].

Eine definitive Aussage über die Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Glykohämoglobinwerte lässt sich erst treffen, wenn die Messverfahren international standardisiert sind.

Die Korrelation von mittlerer Blutglucosekonzentration und Glykohämoglobin wurde in der DCCT-Studie nachgewiesen, bei der 278 Typ-I Diabetiker untersucht wurden. Im Rahmen dessen wurde bei ihnen ein Jahr lang vierteljährlich das HbA_{1c} bestimmt, sowie ein Blutzuckertagesprofil mit 7 Messungen angefertigt. Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,80 bei $p < 0,0001$. Aus dieser Studie wird abgeleitet, dass eine Erhöhung des HbA_{1c} um 1% mit einer Erhöhung der mittleren Blutglucose um 1,99 mmol/l einhergeht [90].

Eine gute Glucosestoffwechseleinstellung liegt gemäß der St. Vincent Deklaration bei HbA_{1c} -Konzentrationen $<6,5\%$ vor. Im Bereich von $6,5\text{--}7,5\%$ wird sie als grenzwertig und $>7,5\%$ als schlecht eingestuft, wobei die genaue Einteilung der Grenzwerte immer von der angewandten Analysemethode abhängig ist [98]. Eine schlechte Einstellung eines Diabetes mellitus geht mit einem erhöhten Risiko von Komplikationen wie der diabetischen Mikroangiopathie mit diabetischer Neuropathie, Makroangiopathie mit KHK, Myokardinfarkt, pAVK, Schlaganfall, sowie Nephropathie und Retinopathie einher. Erhöht wird die Gefahr von Komplikationen wenn zugleich weitere Risikofaktoren wie Hypertonie, Adipositas, Hypercholesterinämie etc. vorliegen. In einer Studie von Henricsson et al. wurde die Inzidenz der diabetischen Retinopathie zehn Jahre nach Diagnosestellung eines Diabetes mellitus untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass Patienten mit Retinopathie eine deutlich schlechtere Glucosestoffwechseleinstellung mit einem durchschnittlichen HbA_{1c} von $8,1\%$ im Gegensatz zu denen ohne (HbA_{1c} $6,8\%$) hatten [46]. Bei einer Reduktion des HbA_{1c} $< 7\%$ kommt es somit zu einer signifikanten Abnahme des Risikos für mikrovaskuläre Komplikationen wie z.B. auch der diabetischen Nephropathie [106,104,94].

Auch für makrovaskuläre Komplikationen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Jesudason et al. beschreiben schon bei HbA_{1c} Werten von $5,6\text{--}6,1\%$ ein $1,8\text{--}2,2$ fach erhöhtes und für Patienten mit einem $\text{HbA}_{1c} \geq 6,2\%$ ein mindestens $2,2$ fach erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Komplikationen [54].

Die Kontrolle des HbA_{1c} sollte bei einem Typ-I Diabetiker alle 3 Monate erfolgen, bei nicht insulinpflichtigen Diabetikern alle 6 Monate, sofern sie in ihrer Einstellung stabil sind [90,69].

Von besonderer Bedeutung ist die Überwachung der Stoffwechseleinstellung bei Schwangeren. Diabetikerinnen haben im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Rate von Totgeburten, perinataler Mortalität und kongenitaler Missbildungen ihrer Kinder [31]. Die HbA_{1c} Konzentration korreliert weiterhin mit der Entwicklung einer fetalen Makrosomie [34]. Bei der Untersuchung von Frühgeburten und termingerechten Geburten bei Frauen mit Diabetes mellitus lag bei den Frauen mit Frühgeburten der HbA_{1c} Wert zuletzt bei durchschnittlich $8,1\%$ wohingegen bei denen mit termingerechter Geburt der durchschnittliche HbA_{1c} Wert $7,4\%$ betrug [60]. Somit

kommt dem HbA_{1c} beim Monitoring von Schwangeren mit Diabetes mellitus grosse Bedeutung zu.

Es wird vermutet, dass das HbA_{1c} darüber hinaus auch zur Diagnostik einer gestörten Glucosetoleranz angewendet werden kann [69,61]. Auch wenn das HbA_{1c} deutlich mit dem Risiko von Komplikationen korreliert, kann es jedoch zur Diagnosestellung bzw. zum Ausschluss einer Diabetes mellitus nur beitragen, wenn der HbA_{1c} Wert deutlich im pathologischen Bereich oder im unteren Normbereich liegt [54].

2.1.6 Ausgewählte Nachweismethoden

Zur Bestimmung des HbA_{1c} kann sowohl Kapillarblut als auch venöses Blut verwendet werden. Als Antikoagulantien eignen sich vor allem EDTA und Heparin. Jedoch kann Heparin-Iodoacetat nicht eingesetzt werden.

Mit den folgenden Methoden kann die HbA₁/HbA_{1c}-Konzentration bestimmt werden, wobei die Nachweise verschiedene Normwerte und Referenzbereiche besitzen.

Kationenaustauschchromatographie

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Auftrennung der verschiedenen Proteine im Blut mittels einer Chromatographiesäule, welche mit einem Ionenaustauscherharz versehen ist. Auf Grund der Glykierung verlieren die Hämoglobine die vorher bestehende positive Ladung an den Aminogruppen. So haften sie nicht so gut an dem negativ geladenen Austauschharz der Chromatographiesäule wie das HbA₀ und werden früher eluiert. Diese Eigenschaft brachte ihnen die Bezeichnung schnelle Hämoglobine ein [98,90]. Es treten jedoch zahlreiche Störfaktoren auf, da auch viele andere veränderte Hämoglobinformen Ladungsunterschiede im Vergleich zum HbA₀ aufweisen. Hier spielen Aldiminform, Carbamylierungen, Acetylierungen, Acetaldehydaddukte, Abbauprodukte, Alterungsartefakte und abnorme Hämoglobine eine Rolle. Für die klinische Diagnostik erfolgt eine ausreichende Auftrennung in die einzelnen Fraktionen. Jedoch wird auch ein Teil des nicht glykierten Hämoglobins miterfasst. Eine analytische Verbesserung lässt sich mit speziellem Säulenmaterial und längeren Trennzeiten erreichen. Die Methode ist empfindlich bezüglich Veränderungen von pH-Wert und Temperatur.

Die Kationenaustauschchromatographie gibt es als teil- oder vollautomatische HPLC/FPLC mit verschiedenen Säulengrößen.

Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Glykohämoglobinen und unglykierten Hämoglobinen beruht auf der Veränderung der Gesamtladung des Moleküls, sowie des isoelektrischen Punktes auf Grund der Glucosebindung an Hämoglobin. Zwei verschiedene Elektrophoresearten sind einsetzbar. Eine Möglichkeit ist eine elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel, die zweite Methode besteht in der isoelektrischen Fokussierung in einem Gel mit einem pH-Gradienten von 5,0-6,5. Eine bessere Auftrennung in die einzelnen Unterfraktionen erfolgt bei der isoelektrischen Fokussierung.

Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie ist die Chromatographiesäule mit an Agarose gebundener m-Aminophenylborsäure versehen. Borsäure bildet mit cis-Hydroxylgruppen Komplexe. So geht sie mit allen Glykohämoglobinen (GesamtHbA₁) eine Verbindung ein, nicht jedoch mit unglykiertem Hämoglobin. Letzteres durchläuft die Säule ohne an diese gebunden zu werden und es kann dessen Menge bestimmt werden. Erst nach Zugabe eines anderen Substrates mit cis-Hydroxylgruppen (z.B. Sorbit) wird das Glykohämoglobin von der Borsäure verdrängt und kann eluiert werden.

Diese Methode ist wenig anfällig für Hämoglobinopathien oder andere veränderte Hämoglobine, jedoch lässt sich nur das Gesamtglykohämoglobin messen. Das standardisierte HbA_{1c} wird aus dem Gesamtglykohämoglobin errechnet.

Immunoassay

Mit einer hohen Spezifität erfassen monoklonale und auch polyklonale Antikörper das HbA_{1c}. Als Epitop dienen die letzten vier bis acht Aminosäuren der β -Kette des Hämoglobins zusammen mit der N-terminal gebundenen Glucose am Lysin. Diese Art des Nachweises kann als Radio- und Enzymimmunoassay, sowie immunturbidimetrisch erfolgen. Der Radioimmunoassay wird häufig als

kompetitiver Immunoassay durchgeführt. Hierbei wird neben dem zu bestimmenden Antigen eine definierte Menge markierten Antigens verwendet. Beide Antigene konkurrieren um die zugegebenen Antikörper und reagieren entsprechend ihrem Verhältnis zueinander. In einem weiteren Schritt wird ungebundenes Antigen aus der Probe entfernt und die Menge des gebundenen, markierten Antigens bestimmt, woraus die Konzentration des gesuchten Antigens errechnet wird. Der Enzymimmunoassay verwendet Antikörper, die auf einer Oberfläche fest gebunden sind. Bei der Überschichtung dieser mit der zu untersuchenden Probe binden die darin befindlichen Antigene an diesen Antikörper. In einem zweiten Schritt werden enzymmarkierte, lösliche Antikörper zugegeben. Diese binden wiederum an das bereits gebundene Antigen und bilden so ein Sandwich. Das Enzym setzt ein zugegebenes Substrat zu einem Farbstoff um, dessen Menge äquivalent zur Menge der gebundenen Antigene ist. Bei der Immunturbidimetrie werden zur Probe mit dem zu bestimmenden Antigen spezifische Antikörper im Überschuß gegeben. Dadurch kommt es zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Die durch diese verursachte Trübung wird photometrisch erfasst und die Antigenkonzentration errechnet.

Abnorme und modifizierte Hämoglobine stören den Assay nicht, jedoch wird das HbA_{2c} wegen des identischen Epitops der glykierten δ -Kette immer miterfasst. Wenn als Epitop nur die letzten vier Aminosäuren der β -Kette dienen, wird bei einer Sichelzellanämie im Gegensatz zu anderen Methoden auch das HbS_{1c} mitgemessen.

Aus diesen Gründen kann der ermittelte Wert neben HbA_{1c} andere glykierte Hämoglobine enthalten.

2.1.7 Störfaktoren und Interferenzen

Hämatologische Erkrankungen, Transfusionen, Blutverluste

Da das Hämoglobin Bestandteil der Erythrozyten ist, wird die Existenz und Nachweisbarkeit von der Lebenszeit der roten Blutkörperchen bestimmt. Alle Erkrankungen, die mit einer Verringerung der erythrozytären Lebensdauer einhergehen, führen zu einer Erniedrigung des HbA_{1c}. Die Konzentration der

Glykohämoglobine nimmt durch die kürzere Lebenszeit und damit verminderte Glykierung ab [90]. Dieses Phänomen tritt zum Beispiel bei der Sphärozytose und Eisen-, Vitamin B12- und Folsäuremangelanämien auf [69,55]. Auch einmalige akute Blutverluste führen zu einer Veränderung des HbA_{1c}. So verringert sich die Glykohämoglobinmenge bei einer Blutspende von 450 ml um 0,5%, wobei der größte Einfluss auf das Ergebnis 6-8 Wochen nach der Spende zu erwarten ist. Bei wiederholten Blutverlusten ist die Abnahme noch größer [90].

Hämolytische Anämien haben einen ähnlichen Effekt auf das HbA_{1c} wie Blutverluste. Anders ist es bei Anämien, die nicht mit einer Hämolyse einhergehen. Hier ist das Glykohämoglobin unverändert oder leicht erhöht, je nachdem wie groß der Anteil fetalen Hämoglobins ist. Zu beachten ist, dass bei Diabetikern die Erythrozytenlebenszeit oft nicht der Norm entspricht. Durch Mikroangiopathien und Niereninsuffizienz ist diese verkürzt [90].

Bluttransfusionen affektieren das HbA_{1c} je nach vorangegangenen Blutverlust, sowie in Abhängigkeit der Glykohämoglobinmenge im Spenderblut.

Neben der verkürzten Erythrozytenlebenszeit kann es auch zur Verlängerung dieser kommen. Dieses ist zum Beispiel bei Patienten nach Splenektomie der Fall. Jedoch scheint es hier keine signifikante Erhöhung des HbA_{1c} zu geben [98].

Hämoglobinopathien

Es existiert eine große Anzahl pathologischer Hämoglobine, die durch Veränderung der Aminosäuresequenz oder auch durch Modifikation des Hämoglobins entstehen können. Diese können die Bestimmung der Glykohämoglobine beeinflussen, wobei vor allem die chromatographischen Methoden davon betroffen sind [110]. Je nachdem wie sich die Oberflächenladung des Moleküls verändert, und dadurch das Elutionsverhalten, erscheint der HbA_{1c}-Wert zu hoch oder zu niedrig. Höhere Werte als 20% HbA_{1c} lassen fast immer auf pathologische Hämoglobinformen schließen, da In-Vitro-Versuche gezeigt haben, dass praktisch nie HbA_{1c}-Werte erreicht werden, die größer als 20% sind [98]. Im Gegensatz zur HPLC/FLPC wird die Affinitätschromatographie durch Hämoglobinopathien nicht beeinflusst. Bei immunologischen Nachweismethoden können Störungen möglich sein, je nachdem

ob das Epitop, welches von den Antikörpern erfasst wird, verändert wurde oder nicht.

Es ist nötig Methoden zu verwenden, die nicht nur zwischen Varianten wie HbC, HbS, beta-Thalassämie etc. differenzieren können, sondern auch zwischen HbA_{1c} und fetalem Hämoglobin, denn es kann bei Erwachsenen selten eine Hämoglobin F Persistenz bestehen oder das HbF bei Thalassämie kompensatorisch erhöht sein [110]. Darüber hinaus ist bei Diabetikern der Anteil des HbF im Allgemeinen erhöht, wobei dieses beim Typ I Diabetes deutlicher ausfällt als beim Typ II [98,90]. Von einer fehlerhaften Bestimmung sind hauptsächlich chromatographische und elektrophoretische Methoden betroffen, wobei die HPLC dennoch HbF von HbA_{1c} unterscheiden kann, wie es auch bei der Affinitätschromatographie und dem Immunoassay der Fall ist [98,90].

Hämoglobin-Modifikationen

Bei niereninsuffizienten und urämischen Patienten ist eine genaue und auch sichere Aussage über die Konzentration von Glykohämoglobinen im Blut nicht möglich, da die Bestimmung durch carbamyliertes Hämoglobin gestört sein kann. Dieses entsteht mittels nichtenzymatischer Bindung von Isozyanat, welches neben Ammoniumionen durch spontanen Zerfall von Harnstoff frei wird, an eine endständige Aminogruppe [98,5]. Durch eine erhöhte Harnstoffkonzentration, wie sie bei Niereninsuffizienz und Urämie vorkommen, wird vermehrt Hämoglobin carbamyliert [98,90]. Die Konzentration carbamylierten Hämoglobins ist somit von der Harnstoffkonzentration im Blut, sowie der Expositionsdauer abhängig. So korreliert die Menge des carbamylierten Hämoglobins mit dem durchschnittlichen Harnstoffspiegel der vorangegangenen ein bis drei Monate. Gleichzeitig dient das carbamylierte Hämoglobin als Marker für eine adäquate Hämodialysetherapie eines niereninsuffizienten Patienten [43]. Harnstoff und Glucose beeinflussen gegenseitig ihre Reaktion mit Hämoglobin. Hierbei senkt aber die Glucose stärker die Bildung carbamylierten Hämoglobins als Isozyanat die Glykierung von Hämoglobin vermindert [4]. Somit ist die Glykohämoglobinbildung bei Diabetikern mit Niereninsuffizienz bei gleicher durchschnittlicher Blutglucosekonzentration geringer als bei einem nierengesunden Diabetiker.

Durch Veränderung der oberflächlichen Ladungsverhältnisse wird carbamylisiertes Hämoglobin zusammen mit HbA_{1a+b} und HbA_{1c} eluiert, und erhöht den vermeintlichen HbA_{1c} Wert [12,110]. Aus diesem Grund sind vor allem ladungsabhängige Nachweismethoden wie zum Beispiel die Ionenaustauschchromatographie und die Elektrophorese von diesem Fehler betroffen [90]. Immunoassays, die monoklonale Antikörper gegen das N-terminale Ende der Betakette mit der gebundenen Glucose verwenden, zeigen keine Kreuzreaktion mit carbamylisiertem Hämoglobin [84]. Ebenso wird die Affinitätschromatographie mit Reaktion von Borsäure mit dem Monosaccharid durch carbamylisiertes Hämoglobin nicht beeinflusst [98].

Als weitere Fehlerquellen kommen bei Niereninsuffizienz und vor allem bei Urämie die verkürzte Erythrozytenlebenszeit und die durch Erythropoietinmangel verursachte Anämie in Betracht. Durch eine Therapie mit Erythropoietin wird die Bestimmung durch die Zunahme der Retikulozytenzahl noch erschwert [90].

Unter den Pharmaka, welche die Bestimmung der Glykohämoglobine stören können, spielt die Acetylsalicylsäure die größte Rolle. Gerade eine Dauermedikation mit höheren Dosen führt zu einer Acetylierung des Hämoglobins, die bis zu 5% betragen kann. Durch diesen Vorgang kommt es zu einer vermehrten negativen Ladung und somit verhält sich das acetylierte Hämoglobin ähnlich dem HbA_{1c} . Auf Grund dieser Eigenschaften sind von der Fehlbestimmung vor allem Elektrophorese und Ionenaustauschchromatographie betroffen. Durch hohe Dauergaben von Acetylsalicylsäure im Bereich von 500 mg/d kommt es am ehesten zu einer deutlichen Acetylierung, während kleine Dauerverabreichungen von 200 – 300 mg/d oder auch kurzzeitige, extrem hohe Dosierungen von bis zu 2000 mg/d keinen Einfluss auf die Glykohämoglobinbestimmung haben sollen [90].

Die Konzentration von Glykohämoglobinen im Blut kann auch durch einen gesteigerten Alkoholkonsum erhöht sein. So kann trotz normaler Glucosetoleranz die HbA_{1c} -Konzentration erhöht erscheinen. Vor allem bei einer Ethanolzufuhr von 150 – 200 g/d kommt es zur Bildung von Acetaldehydaddukten [98] am Hämoglobin. Nach Absetzen stellen sich mit einer Halbwertszeit von 11 Tagen normale HbA_{1c} -Werte ein [90].

Als weitere, jedoch seltenere Ursachen für eine falsch hohe Glykohämoglobinkonzentration kommen β -Lactam-Penicillin, Phenobarbital, Hydroxyurea, chronische Bleivergiftungen und eine Galaktosämie in Betracht [90].

Labiles Glykohämoglobin

Der Bildung der stabilen Ketoaminform des HbA_{1c} geht eine Vorstufe voraus. Diese ist wie schon oben beschrieben die labile Aldiminform des Glykohämoglobins. Auf immunologische und affinitätschromatographische Nachweise hat diese Form keinen Effekt, jedoch interferiert sie mit der Elektrophorese und Chromatographie. Dadurch kann es zu einer Messwerterhöhung kommen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll die labile Aldiminform vor der Analyse zu entfernen. Dazu eignen sich: Waschen der Erythrozyten, Dialyse, die Verschiebung des pH-Wertes oder eine chemische Elimination [98].

2.2 C-reaktives Protein – ein Entzündungsmarker

2.2.1 Einführung

Das CRP wurde 1930 erstmals von Tillet und Francis beschrieben, die diesem Protein den Namen C-reaktives Protein nach der Fähigkeit gaben am C-Polysaccharid der Zellwand von *Streptokokkus pneumoniae* zu binden [51,28].

Es gehört zu den Akute-Phase-Proteinen und wird in der Leber gebildet. Seine Struktur wird von fünf identischen, nicht glykolysierten Untereinheiten gebildet. Diese sind zu einem Ring zusammengelagert und nicht kovalent gebunden. Die einzelnen Untereinheiten bestehen aus einer Polypeptidkette aus 206 Aminosäuren und besitzen jeweils eine Masse von etwa 23,5 kD [51,98]. Wegen seiner charakteristischen pentameren Struktur gehört das CRP zur Gruppe der Pentraxine, welche calciumbindende Proteine mit Immunabwehreigenschaften sind [98]. Bei verschiedenen Zustandsformen des CRP existieren mindestens acht verschiedene Epitope, gegen die es monoklonale Antikörper gibt, die für Nachweise eingesetzt werden [113].

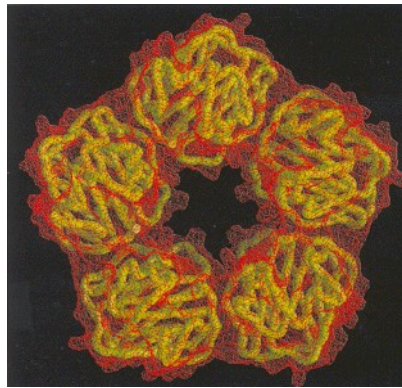


Abb. 2.4: Die pentamere CRP-Struktur [51]

Von allen Akut-Phase-Proteinen steigt das CRP bei bakteriellen Infektionen am schnellsten und am stärksten an, wodurch es zum bedeutendsten Parameter unter diesen geworden ist [49,28]. Auf Grund der schnellen, empfindlichen und weitreichenden Erfassung entzündlicher Prozesse ist das C-reaktive Protein dem Differentialblutbild, der Temperaturerhöhung und der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit in seiner diagnostischen Aussage überlegen [28].

2.2.2 Bildung des C-reaktiven Proteins

Das CRP wird hauptsächlich in der Leber von Hepatozyten synthetisiert, wobei sich die genetische Information beim Menschen auf dem Chromosom 1 befindet [51]. Neben den Leberzellen können auch andere Gewebe bzw. Zellen im Körper das C-reaktive Protein bilden, jedoch ist der Anteil am Gesamt-CRP so gering, dass die extrahepatische Syntheseleistung für die Plasmakonzentration nicht von Bedeutung ist [98].

Eine vermehrte Produktion des C-reaktiven Proteins wird durch inflammatorische Zytokine induziert, wobei neben Interleukin-1, $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{INF-}\gamma$, das Interleukin-6 den größten Stimulus darstellt [63,112]. Die Induktion der CRP Synthese durch Zytokine findet auf Transkriptionsebene statt. Der stimulierte Transkriptionsfaktor $\text{c/EBP}\beta$ bindet dabei an den CRP Promotor, wobei das c-Rel Protein durch Bindung an $\text{c/EBP}\beta$ die CRP Expression noch verstärkt [2]. Das synthetisierte

CRP wird normalerweise, an zwei Carboxylesterasen gebunden, im endoplasmatischen Retikulum gespeichert. Während der Akute-Phase-Reaktion nimmt die Bindungsaffinität dieser Carboxylesterasen ab, so dass weniger CRP im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird [114]. Bei einer maximalen Akute-Phase-Antwort können bis zu 20% der gesamten Leberproteinsyntheseleistung von der Bildung des CRP eingenommen werden. Normalerweise werden von der Leber pro Tag 1-10mg CRP produziert, bei einer akuten Entzündung kann die Rate in kurzer Zeit um das 1000fache auf über 1g pro Tag ansteigen [98,63]. Nach Wegfall der Induktion der CRP-Synthese durch Il-6, fällt innerhalb von 2-4 Stunden die Syntheseleistung wieder in den physiologischen Bereich ab. Die biologische Halbwertszeit für das freie CRP beträgt 19h. Sie ist jedoch bei an Liganden gebundenem CRP verringert.

Da noch keine genetischen Defekte des C-reaktiven Proteins beschrieben wurden, wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um ein essentielles Protein handelt. Das CRP wird nicht nur vom Menschen gebildet, sondern von allen Vertebraten und auch den meisten Nicht-Vertebraten [98].

2.2.3 Funktion des CRP

Die Funktion des CRP besteht in der Opsonierung körpereigenen und körperfremden Materials, welches entfernt werden soll. Durch die Bindung an diese Substanzen werden Makrophagen und das Komplementsystem aktiviert. Im Speziellen hat es drei Haupteigenschaften aus denen viele Funktionen hervorgehen:

1. Bindung an Phosphorylcholin
2. Komplementaktivierung
3. Bindung an Zellrezeptoren (Fc-Rezeptoren o. spezif. CRP-Rezeptoren) [51]

Die Fähigkeit zur Bindung an Phosphorylcholin, Chromatin und Histonen bietet die Möglichkeit der Opsonierung von Fragmenten körpereigener zugrunde gegangener Zellen, die toxisch oder allergen wirken könnten, sowie körperfremder Organismen und deren Bestandteile [98,30]. Eine Anheftung an Zellen ohne Rezeptoren findet jedoch nur statt, wenn die Lipiddoppelschicht der Zellmembran defekt ist und Phosphorlipide aus dem Inneren der Membran an die Oberfläche treten. Im

Gegensatz dazu kann das CRP bei exogenem Material an den lebenden und unbeschädigten Organismus binden, da das Phosphorylcholin Bestandteil der Zellwände von Bakterien, Pilzen und Parasiten ist [98,63].

Sobald die Bindung an eine der genannten Substanzen erfolgt ist, wird durch den entstandenen Komplex aus CRP und Komplementfaktor C3b auf der Oberfläche das Komplementsystem aktiviert [112]. Aktivierte Makrophagen sorgen für die Beseitigung des Komplexes. Über eine Bindung an T-, B- und Null-Lymphozyten über Fc-Rezeptoren als s-CRP (surface-CRP) fördert es die Aktivierung von Natürlichen Killerzellen, teilweise auch durch direkte Bindung an diese [53]. Ein weiterer großer Stimulus für die Makrophagenaktivierung sind Fragmente des CRP-Ligand-Komplexes, die durch Proteasen von gebundenen neutrophilen Granulozyten entstehen. Neben dieser Aktivierung findet gleichzeitig eine Inhibition der neutrophilen Granulozytenfunktion durch die Spaltprodukte statt [98,63].

Weitere Funktionen des CRP sind die Behinderung der Thrombozytenaggregation und damit die Herabsetzung des Thromboserisikos, sowie die Bindung an low-density-Lipoproteine und Entfernung von LDL aus atherosklerotischen Plaques durch Anheftung an Rezeptoren von Phagozyten [51].

2.2.4 CRP und andere Entzündungsparameter

Bei Erkrankungen im Rahmen einer Infektion gibt es vielerlei Symptome und Parameter, die zur Diagnostik herangezogen werden können. Hierzu zählen neben einer Erhöhung der Körpertemperatur, der Leukozytenzahl und der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) vor allem die Proteine der Akute-Phase-Reaktion. Sie haben unter anderem die Funktion Zellen vor Schädigung durch die Akute-Phase-Reaktion zu schützen. Dieses erfolgt durch ihre Eigenschaften als Enzyminhibitoren, Transportproteine und Induktoren zur Synthese von Proteinen des Gerinnungs- und Komplementsystems. Unter den Akute-Phase-Proteinen zeigen das Serum Amyloid A Protein (SAA) und das C-reaktive Protein den größten Anstieg. Die Erhöhung kann bis zum 1000fachen des normalen Wertes betragen [51,63].

Ein häufiges und sehr weit verbreitetes Merkmal für eine Erkrankung ist der Anstieg der Körpertemperatur auf über 37,5°C. Jedoch wird dieses Merkmal von vielen

verschiedenen Faktoren beeinflusst. So ist die Körpertemperatur einerseits auch von der Umgebungstemperatur abhängig und andererseits kann eine Erhöhung bei lokal begrenzten Prozessen fehlen [98]. Bei verschiedenen Patienten kann es zum Ausbleiben von Fieber trotz einer schwerwiegenden Infektion kommen. Hierzu gehören vor allem ältere Patienten, Kleinkinder, sowie immunsupprimierte Patienten. Zu einer Fehlbeurteilung der Körpertemperatur können weiterhin auch fiebersenkende Pharmaka führen, welche zu einer Unterdrückung oder Senkung des Fiebers mit mangelnder Beeinflussung des entzündlichen Geschehens führen [49].

Für eine bakterielle Infektion ist meist eine Leukozytose charakteristisch, so dass man bei Verdacht auf eine derartige Erkrankung in der Regel eine Linksverschiebung im Differentialblutbild erwarten würde. Auch wenn die Leukozytenzahl deutlich auf eine Infektion hinweisen kann, hat sie den Nachteil, dass zum einen lediglich bakterielle Erreger erfasst werden, zum anderen es unter diesen Erkrankungen auch einige gibt, die selbst bei einer schweren Infektion, keine Leukozytose verursachen. Hierzu gehören z.B. Typhus, Brucellose, Miliartuberkulose und Rickettsiose [49]. Selbst bei einer Pneumokokkenpneumonie kann ein Anstieg der Leukozytenzahl fehlen. Ebenso ist dieses der Fall, wenn eine Leukozytopenie vorliegt, sei es auf Grund einer Grunderkrankung oder in Folge einer Zytostatikabehandlung.

Demgegenüber ist das CRP in der Lage eine Differenzierung zwischen viralen und bakteriellen Erregern zuzulassen und zeigt selbst bei immunsupprimierten Patienten Infektionen an [86,95].

Ein guter und weit erfassender Suchtest auf Infektionen und Tumorerkrankungen ist die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG). Sie ist von zahlreichen Faktoren abhängig und somit sehr störanfällig. Zu diesen gehören der Hämatokrit, die Erythrozytenzahl, sowie deren Form, Größe und Ladung. Weiterhin haben auch Nicht-Akute-Phase-Proteine wie Immunglobuline und andere Serumproteine wie das Albumin Einfluss auf das Ergebnis der BSG [63]. Damit ist die BSG Erhöhung auch ein indirektes Zeichen für eine CRP Erhöhung. Zusätzliche Faktoren sind die Fettaufnahme mit der Nahrung, Schwangerschaft, Tageszeit und Temperatur. Das CRP zeigt im Gegensatz dazu keine tageszeitlichen Schwankungen und bleibt bei gesunden Personen im Referenzintervall. Kurzzeitige Schwankungen über diesen Bereich sind nicht zu erwarten [70,66]. Da die BSG neben der großen Anzahl der

Störfaktoren auch nur sehr langsam reagiert, ist das C-reaktive Protein gerade bei akuten Entzündungen auf Grund seiner geringen Anfälligkeit gegenüber Störungen und seinem sehr raschen Anstieg deutlich überlegen [100]. Bei der Differenzierung zwischen bakteriellen und viralen Infektionen kann die BSG keinen Beitrag leisten. Jedoch ist die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit ohne Zweifel von großer Bedeutung gerade in der Verlaufskontrolle langdauernder entzündlicher Erkrankungen, wobei hier vor allem die Tuberkulose zu erwähnen ist. Einen weiteren Vorteil bietet die BSG in der Früherkennung von Tumorerkrankungen, da sie in diesem Fall sensitiver als das CRP reagiert.

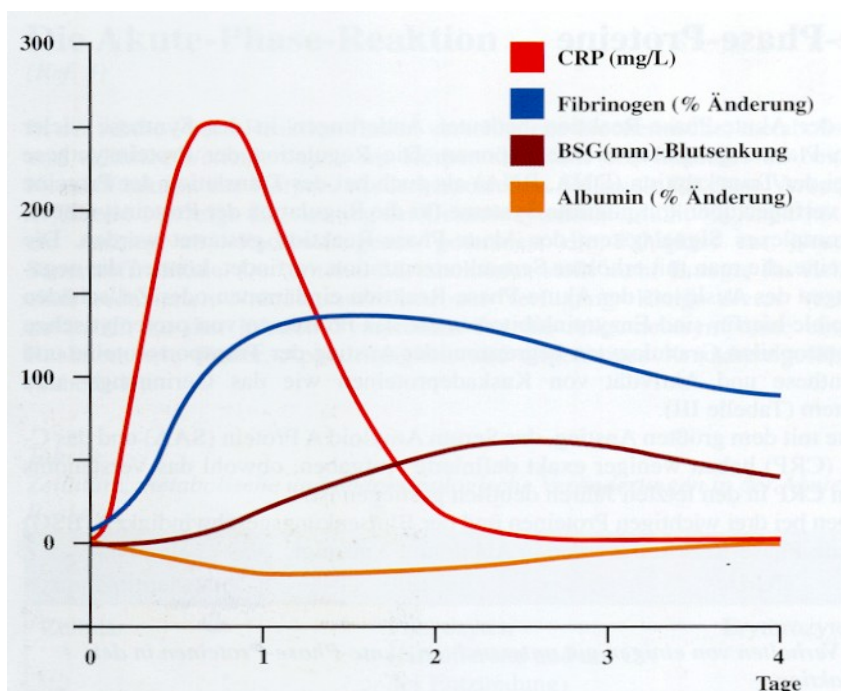


Abb. 2.5: Blutwerteveränderung in der Akute-Phase-Reaktion [51]

2.2.5 Klinische Aussagekraft des CRP

Je nach Höhe des CRP-Anstiegs lässt sich auf die Art der Erkrankung bzw. Infektion schließen, denn der Grad der Erhöhung der CRP-Produktion in der Leber spiegelt den Umfang der Schädigung des Gewebes wieder, sowie das Ausmaß der Entzündungsaktivität. So gibt es charakteristische Grenzen, welche trotz der Unspezifität des Markers einen Hinweis auf die Ursache liefern [98,63].

So kann eine Erhöhung des CRP über den Normbereich auf akute und chronische Entzündungen, Autoimmun- und Immunkomplex-Erkrankungen, Myokardinfarkte, tiefe Venenthrombosen, rheumatoide Erkrankungen, sowie auf Gewebnekrosen und maligne Tumore hinweisen [63].

Etwa sechs Stunden nach einem akuten Stimulus wie z.B. einem Trauma steigt das CRP im Blut an. Die höchste Konzentration wird nach 48 Stunden erreicht. Aus diesem Grund sollte ein quantitativer Nachweis in einem Zeitraum von maximal drei Tagen nach dem Stimulus erfolgen um eine richtige Aussage treffen zu können. Generell ist ein Anstieg des C-reaktiven Proteins immer pathologisch.

Für beide Geschlechter liegt das Referenzintervall und damit der Bereich, in welchem eine Erkrankung ausgeschlossen werden kann, bei einer CRP Konzentration $<10\text{mg/l}$ [87,33].

Bei einer leichten Entzündung kommt es nur zu geringeren Anstiegen des CRP zwischen 10 und 50 mg/l. Hierzu zählen zum Beispiel lokale bakterielle Infektionen, Bronchitis, Zystitis, Abszesse, Herzinfarkt, Venenthrombose, operative und unfallbedingte Traumen, maligne Tumoren, rheumatische Erkrankungen, die inaktiv sind, sowie fast alle viralen Infektionen.

Den größten Reiz für die Akute-Phase-Reaktion stellen bakterielle Endotoxine dar. So kann es bei Infektionen mit gram-negativen Erregern zu einem Anstieg des CRP auf bis zu 500 mg/l kommen. Im Gegensatz dazu führen Erkrankungen durch Parasiten nur selten zu Erhöhungen des C-reaktiven Proteins auf mehr als 50 mg/l.

Bei CRP-Konzentrationen größer 50 mg/l muss von einer schweren Infektion ausgegangen werden. Dieses ist ein Zeichen dafür, dass auf jeden Fall eingeschritten werden muss. Werte von über 100 mg/l weisen oft auf eine bakterielle Infektion hin.

Aufgrund dieses Zusammenhangs lassen sich manche Erkrankungen und ihre Ursachen gut differenzieren. Es kann vor allem unterschieden werden, ob es sich um einen bakteriellen oder viralen Erreger handelt [95]. Wenn bei einer Atemwegsinfektion oder Meningitis die CRP-Konzentration über 100 mg/l liegt, weißt dieses, wie oben beschrieben, auf einen bakteriellen Erreger hin.

Die CRP-Bestimmung kann außer zur Diagnostik zur Verlaufskontrolle von Erkrankungen und Therapien herangezogen werden. Hier spielt die Kontrolle von Antibiotikatherapien eine große Rolle, denn über das CRP kann frühzeitig festgestellt

werden, ob die Therapie wirkungsvoll ist. Des weiteren kann der CRP-Wert als Indikation für eine antibiotische Therapie ohne das Vorhandensein einer mikrobiologischen Diagnostik herangezogen werden, wenn es sich zum Beispiel um Risikopatienten handelt, bei denen die Mikrobiologie nicht abgewartet werden kann. Im Gegenzug kann eine Antibiose auch abgesetzt werden, wenn das C-reaktive Protein im Normalbereich liegt. Schofield et al. konnten zeigen, dass die CRP Bestimmung zur Diagnose verborgener oder unklarer Infektionen bei akuter Leukämie, sowie als Anhaltspunkt zur Einleitung einer antibiotischen Therapie gut geeignet ist [86].

Bei rheumatischen Erkrankungen wie z.B. die rheumatoide Arthritis kann das CRP mit seinem relativ schnellen Anstieg oder Abfall helfen eine geeignete entzündungshemmende Therapie ausfindig zu machen, gerade dann, wenn die Wirkung der Therapie klinisch nicht oder nur schwer zu beurteilen ist.

Der CRP-Anstieg erfolgt meist vor einer Änderung der klinischen Symptomatik, daher können auch sich entwickelnde Komplikationen vorhergesagt werden wie z.B. die Entwicklung einer Riesenzellarteriitis bei einer Polymyalgia rheumatica [98]. So eignet sich das CRP gut zum Monitoring rheumatoider Erkrankungen [63].

Wegen seiner Konstanz bei gesunden Individuen kann das CRP auch über eine geringe Erhöhung seines Spiegels Hinweise auf pathologische Vorgänge liefern. Eine chronische Entzündung von Endothelien ist eine entscheidende Komponente für die Entwicklung von Atherosklerose. Das CRP ist in der Lage das Risiko für zukünftige Ereignisse bei Patienten vorherzusagen. Diese prognostische Aussage betrifft somit viele verschiedene Erkrankungen wie Myokardinfarkte, ischämische Insulte, periphere vaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus II mit seinen Begleiterkrankungen [63,82,52].

Wenn hohe CRP-Konzentrationen persistieren ist dieses ein Zeichen für ein Versagen der angewandten Therapie oder deutet auf eine schlechte Prognose beispielsweise bei malignen Tumoren, Infektionen oder Herzinfarkten hin.

2.2.6 Ausgewählte Nachweismethoden

Für die Bestimmung des CRP wird meist Plasma oder Serum verwendet. Es gibt jedoch auch Methoden, bei denen aus kapillärem und venösem Vollblut das C-reaktive Protein ermittelt werden kann. Als Antikoagulantien eignen sich meist Ammoniumheparinat und EDTA.

Es existieren mehrere Methoden zum Nachweis des CRP, wobei alle auf immunologischen Reaktionen beruhen. Nachfolgend werden verschiedene Nachweismethoden zur Bestimmung des C-reaktiven Proteins nach Dörner [28] beschrieben:

Nephelometrie / Turbidimetrie

Beide Prinzipien messen die CRP-Konzentration in Serum oder Plasma, in dem das in der Probe enthaltene CRP als Antigen wirkt und mit zugesetzten Antikörpern reagiert. Wenn Antigen und Antikörper in gleichen Konzentrationen vorliegen, kommt es zur Ausbildung unlöslicher Ag/Ak-Komplexe. Sind aber Antigen oder Antikörper im Überschuß vorhanden liegen die Komplexe in löslicher Form vor. Dieses wird gut durch die Heidelberger Kurve veranschaulicht.

Die Immunnephelometrie erfasst die durch den Komplex verursachte Trübung der Probe über den Grad der Streuung von Licht, welches durch das Reaktionsgefäß geschickt wird. Bei der Immunturbidimetrie wird speziell UV-Licht verwendet und photometrisch dessen Extinktion durch den Ag/Ak-Komplex gemessen. Um ein schnelleres Ausfällen des Komplexes zu erreichen wird meist Polyethylenglycol zugesetzt. Diese Methoden haben eine sehr kurze Reaktionsdauer und sind gut mechanisierbar.

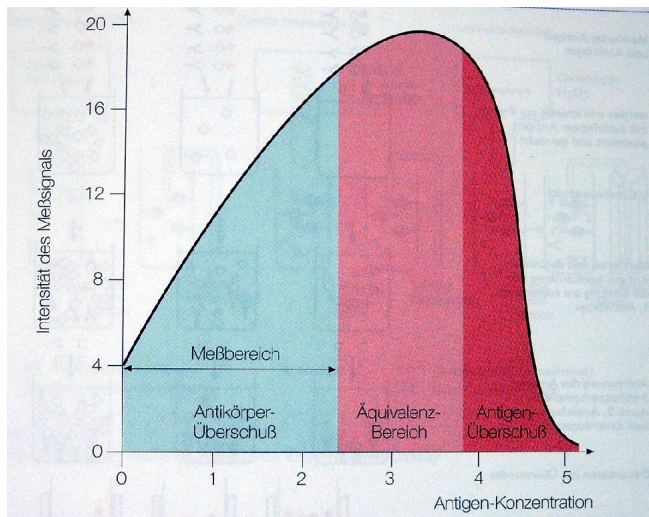


Abb. 2.6: Heidelberger Kurve [28]

Enzymimmunoassay

Bei den Immunoassays wird zwischen zwei Formen unterschieden. Zum einen gibt es nicht-kompetitive Assays, zum anderen kompetitive. In der folgenden Beschreibung des Enzymimmunoassays wird die Methode des nicht-kompetitiven Nachweises behandelt. Der im nächsten Punkt behandelte Fluoreszenzimmunoassay wird im Gegenzug in Form einer kompetitiven Methode betrachtet.

Das Messprinzip beruht ebenfalls auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. In diesem Fall ist ein gegen das CRP gerichteter Antikörper auf einer Oberfläche gebunden. Dieses kann die Wand eines Reagenzröhrchens, eine Filtermembran oder ähnliche Reaktionsflächen sein. Der gebundene Antikörper liegt im Überschuss vor.

Auf die mit dem Antikörper beschichtete Fläche wird das zu untersuchende Material aufgetragen und es kommt zur Bindung des gesamten in der Probe vorhandenen C-reaktiven Proteins, welches als Antigen wirkt.

Im zweiten Schritt wird die Reaktionsfläche mit einem zweiten Antikörper überschichtet, welcher enzymmarkiert ist. Dieser Antikörper ist gegen CRP gerichtet und bindet an den bereits von den stationären Antikörpern festgehaltenen Antigenen. Nach dem Waschen der Reaktionsfläche sind auf dieser genau so viele enzymmarkierte Antikörper gebunden wie auch Moleküle des C-reaktiven Proteins.

Als abschließender Reaktionsschritt wird ein Substrat zugegeben, welches über das Enzym umgesetzt wird, mit welchem der zweite Antikörper konjugiert ist. Bei der

chemischen Umsetzung des Substrates entsteht ein Farbstoff, dessen Menge direkt proportional zur Menge des vorhandenen Enzyms und damit auch der Konzentration des CRP in der Probe ist.

Mittels Photometrie wird der Farbstoff erfasst und daraus die Konzentration des C-reaktiven Proteins berechnet.

Fluoreszenzimmunoassay

Der Unterschied zwischen den verschiedenen Immunoassays liegt in der Art der verwendeten Markierungsmoleküle. Während bei enzymatischen Methoden die Farbstoffentstehung durch die Substratumsetzung des Enzyms als quantitativer Indikator dient, ist es bei dieser Methode die ausgesandte Lichtmenge gebundener fluoreszierender Partikel.

Der kompetitive Nachweis des CRP erfolgt über eine Konkurrenzreaktion zwischen dem in der Probe vorhandenen Antigen und dem zugesetzten fluoreszenzmarkierten Antigen. Dazu werden zum Probenvolumen definierte Mengen von Antikörper und markiertem Antigen hinzugegeben. Beide Formen des Antigens binden nun an die Antikörper und zwar in dem Verhältnis wie sich ihre Konzentrationen zueinander verhalten.

Um die entstandenen Komplexe von ungebundenem CRP zu trennen werden diese durch einen zweiten Antikörper gebunden und das Reaktionsgemisch zentrifugiert. Der Überschuss wird abgegossen.

Durch Messung der ausgesandten Lichtmenge und dem daraus ermittelten Verhältnis von markiertem und unmarkiertem Antigen, sowie der bekannten Konzentration des verwendeten Antikörpers und Antigens, kann die Konzentration des C-reaktiven Proteins in der Probe ermittelt werden.

Latexagglutinationstest

Bei dieser Art Nachweisreaktion kommen Latexpartikel zum Einsatz, die mit CRP-Antikörpern beschichtet sind. Diese werden zusammen mit Serum der zu untersuchenden Probe auf einen Probenträger aufgetragen. Ab einer bestimmten Menge an Antigen kommt es zur Agglutination von CRP-Antigen und beschichteten Latexpartikeln, was an einer Ausflockung der milchigen Lösung zu erkennen ist.

Dieser Nachweis dient heute nur als Suchtest und ist nur semiquantitativ. Darüber hinaus ist er gegenüber Störfaktoren sehr anfällig. Zu diesen gehören vor allem Lipide, Bilirubin, Rheumafaktoren und die Leukozytose [49].

Radiale Immundiffusion

Mit der radialen Immundiffusion lässt sich das CRP quantitativ nachweisen. Grundlage des Tests bildet eine Agarplatte, in deren Gel in einer gleichmäßigen Verteilung und damit fester Konzentration pro Volumen Antikörper gegen das C-reaktive Protein enthalten sind. In vorgestanzte Löcher werden 5µl Serum pipettiert. Auf Grund des Konzentrationsgefälles diffundiert das Antigen von dem Stanzloch in die Umgebung. Bei der Entfernung, bei der Antigen und Antikörper in gleicher Konzentration vorliegen, kommt es zur Komplexbildung und damit zur Präzipitation. Über den Durchmesser des Präzipitatrings lässt sich die Antigenkonzentration im Serum bestimmen. Dabei verhält sich das Quadrat des Durchmessers linear zur Serumkonzentration des CRP [49,28].

Nachteil dieser Methode ist die lange Dauer des Nachweises, die zwischen 1 und 3 Tagen liegt, was die radiale Immundiffusion für die Praxis ungeeignet macht.

Sonderfall immunometrisches Durchflussprinzip

Das immunometrische Durchflussprinzip basiert auf einem Enzymimmunoassay. Der Sonderfall ist hier, dass als Reaktionsoberfläche eine Filtermembran verwendet wird, die mit einem spezifischen Antikörper beschichtet ist. Der Ablauf des Nachweises ist wie der der schon beschriebenen Immunoassays. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass alle Reagentien, Proben und Waschlösungen auf die Membran aufgetragen werden und diese „durchfließen“, so dass nur das nachzuweisende Antigen und die gleiche Menge markierter Antikörper an der Oberfläche durch die stationären Antikörper gebunden werden. Alle Lösungen und deren Bestandteile, die nicht immunologisch reagieren fließen in die Tiefe des Filters. So kann auf der Membranoberfläche über Densitometrie die Menge der gebundenen Antigene bestimmt werden.

2.2.7 Störfaktoren und Interferenzen

Die Referenzwerte, die bei der Diagnostik verwendet werden, sind vom Lebensalter des Patienten abhängig. Es wurde ein signifikanter Anstieg des CRP mit zunehmendem Alter beschrieben [51,52].

Die Akute-Phase-Reaktion ist von einer ausreichenden Versorgung des Körpers mit Nährstoffen und Hormonen abhängig, um adäquat auf einen entzündlichen Reiz reagieren zu können. Hierzu gehören vor allem Glucose und Aminosäuren, sowie Glukagon, Insulin, Cortisol und die Schilddrüsenhormone. In der praktischen Anwendung der CRP-Diagnostik beeinflussen jedoch nur extreme Mangelzustände die CRP-Synthese in solchem Maß, dass keine korrekte Aussage getroffen werden kann [51].

Erhöhte CRP Konzentrationen werden bei Übergewicht durch eine vermehrte IL-6 Bildung im Fettgewebe und bei Insulinresistenz beobachtet [52].

Darüber hinaus spielt es eine große Rolle, ob die betreffende Person Raucher oder Nichtraucher bzw. ehemaliger Raucher ist. Bei Rauchern liegt die CRP-Konzentration im Serum aufgrund der Gewebeschädigung und entzündlichen Effekte wesentlich höher als bei Nichtrauchern. Das Ausmaß der Erhöhung ist direkt vom Zigarettenkonsum pro Tag abhängig [51,52].

Wie schon oben beschrieben steigt der CRP-Wert auch bei körperlicher Betätigung.

Zu Beginn einer Schwangerschaft ist die CRP-Konzentration normal. Ab ca. der 20. Woche steigt das CRP in den oberen Normbereich bis er bei der Geburt dann bis zu 20 mg/l erlangen kann. Danach kann es, abhängig von der Art der Geburt, noch weiter ansteigen, fällt dann jedoch wieder in den Normalbereich ab.

Trotz der hohen Sensibilität der CRP-Synthese auf entzündliche Stimuli gibt es Erkrankungen bei den es zu keinem Anstieg der CRP-Konzentration kommt. Zu diesen Erkrankungen zählen vor allem der systemische Lupus erythematoses [63], die Colitis ulcerosa, das Sjögren Syndrom, die Dermatomyositis, die Sklerodermie und teilweise auch die rheumatoide Arthritis. Wenn bei Patienten mit diesen Erkrankungen aber andere entzündliche Erkrankungen oder Komplikationen hinzukommen, steigt der CRP-Plasmaspiegel dennoch an wie bei anderen Patienten ohne eine derartige Grunderkrankung [51].

Zu einer Verringerung oder einem fehlenden Anstieg des CRP kann es kommen, wenn der Patient vorher mit Antibiotika oder Corticosteroiden behandelt wurde, so dass der Stimulus zur CRP-Synthese geringer ausfällt oder die Immunreaktion an sich unterdrückt wird.

2.3 D-Dimere

Venöse Thrombembolien, tiefe Beinvenenthrombosen und Lungenembolie gehen mit hoher Morbidität, sowie Mortalität einher. Daher ist hier die Diagnosestellung von besonders großer Bedeutung. Die eingehende körperliche Untersuchung kombiniert mit Doppler-Ultraschalluntersuchung oder Lungenperfusionsszintigraphie, je nach Verdachtsdiagnose, haben sich etabliert. Dennoch werden etwa 70% aller Lungenembolien nicht erkannt [44]. Darüber hinaus sind oft weitere Untersuchungen nötig, um die angemessene Behandlung der Erkrankung zu ermitteln. Die Bestimmung der D-Dimere hat sich in der weiteren Klärung als nützlich erwiesen.

2.3.1 Entstehung der D-Dimere

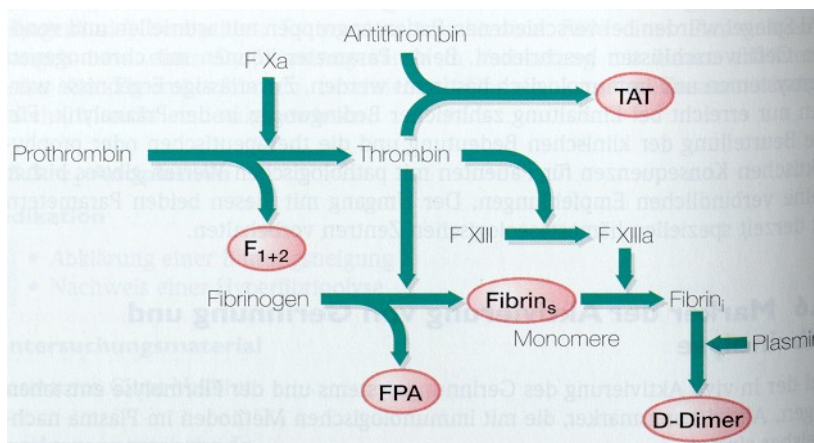


Abb. 2.7: Marker der Aktivierung von Gerinnung und Fibrinolyse [28]

Im Verlauf der Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt es unter anderem unter dem Einfluss von Thrombin zur Bildung von Fibrinmonomeren aus Fibrinogen.

daraufhin führt der Faktor XIIIa an den Gefäßwänden zur Quervernetzung der Fibrinmonomere [28].

Bei einer gesteigerten Gerinnungsaktivität im Körper kommt es in der Folge auch zu einem vermehrten Abbau der entstandenen Proteine. Man unterscheidet hierbei zwei Formen der Hyperfibrinolyse, die primäre und die sekundäre Form. Die primäre Hyperfibrinolyse führt zur Bildung von nachweisbaren Spaltprodukten des Fibrinogens. Bei der primären Form fehlt eine Gerinnungsaktivität [98].

Im Gegensatz dazu kommt es bei der sekundären oder auch reaktiven Hyperfibrinolyse zur Auflösung eines tatsächlichen Gerinnsels. Aus diesem Grund wird hier nicht Fibrinogen, sondern vernetztes Fibrin gespalten. Dabei entstehen charakteristische Spaltprodukte, welche als D-Dimere bezeichnet werden. Um einen besseren Einblick in die Entstehung der D-Dimere zu bekommen soll noch einmal der letzte Abschnitt der Gerinnungskaskade betrachtet werden.

Durch die Einwirkung von Thrombin werden vom Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B abgespalten, welche die oben genannten Fibrinmonomere bilden. Diese Monomere sind löslich, sie können sich aber spontan vernetzen. Der Gerinnungsfaktor XIIIa kann dann durch seine Einwirkung zur Stabilisierung der vernetzten Moleküle führen. Der Faktor XIIIa ist eine Endopeptidase und sorgt für die Ausbildung von Peptidbindungen zwischen den α - und auch γ -Ketten der verschiedenen Fibrinmoleküle. Das Ergebnis dieses Prozesses ist ein Fibrinnetz, das unlöslich ist. Die D-Domänen nebeneinander gelegener Fibrinmonomere sind in diesem miteinander verknüpft.

Um dieses Gerinnsel wieder auflösen zu können wird ein Enzym zur Spaltung des quervernetzten Fibrins benötigt. Diese Aufgabe erfüllt das Plasmin. Es führt zur Bildung verschiedener Spaltprodukte, die alle mindestens zwei miteinander verknüpfte D-Strukturen enthalten, welche als D-Dimer bezeichnet werden. Sie können jedoch auch als Trimere oder Tetramere vorliegen. Durch einen weiteren Abbau der Spaltprodukte wird die D-Dimerstruktur als eigenständiges Molekül frei, welches eine Masse von etwa 180kD besitzt. Das ebenfalls bei der Fibrinolyse entstehende E-Fragment kann mit dem D-Dimer über H-Brücken eine Bindung eingehen. Der entstandene DD/E Komplex hat dann ein Molekulargewicht von

230kD. Das einzelne D-Dimermolekül ist auf Dauer nicht stabil, es weist eine physiologische Halbwertszeit von 8h auf.

Die Spaltprodukte des quervernetzten Fibrins beinhalten alle die Struktur des D-Dimers. Da diese Struktur, wie auch das Einzelmolekül bei den meisten immunologischen Tests nachgewiesen wird, sind die D-Dimere eine gemeinsame Bezeichnung für Fibrinspaltprodukte.

2.3.2 Klinische Aussagekraft

Für einen Normalbefund wird im Allgemeinen ein Referenzbereich von 20-400 µg/l angegeben, wobei hier zu beachten ist, dass es sich nur um Orientierungswerte handelt. Die genauen Referenzbereiche sind von der jeweiligen Nachweismethode abhängig und werden vom Hersteller für jeden Test ermittelt. Sie sind von der Spezifität des Nachweises abhängig, sowie vom Antigen des Kalibrators. Weiterhin sorgen auch unterschiedliche Methoden für differierende Referenzintervalle [98].

Dadurch dass nur Fibrinspaltprodukte nachgewiesen werden, welche nur aus dem Abbau eines Thrombus hervorgehen können, kann der Nachweis nicht durch eine Fibrinogenolyse gestört werden.

Erhöhte D-Dimerwerte treten bei intravasaler Gerinnung, sekundärer Hyperfibrinolyse, tiefen Beinvenenthrombosen und Lungenembolien auf. Jedoch kann von einem D-Dimeranstieg nicht verlässlich auf eine Thrombosierung geschlossen werden. Das Fehlen von D-Dimeren ist aber als Ausschlusskriterium derartiger Erkrankungen zu bewerten. Untersuchungen haben gezeigt, dass die D-Dimere einen hohen negativen Vorhersagewert besitzen [11,58].

Wenn eine Lysetherapie eines Thrombus erfolgt, kann über eine begleitende D-Dimerbestimmung der Verlauf und Erfolg der Behandlung beurteilt werden.

Bei arteriellen Thrombembolien, Artherosklerose und frischen Myokardinfarkten werden wenige Fibrinspaltprodukte frei, so dass hier die D-Dimer-Diagnostik begrenzt ist. Ein Nutzen bei Komplikationen des Myokardinfarktes wird erwähnt [44].

Weiterhin erhöhen auch Verbrauchskoagulopathien und eine disseminierte intravasale Gerinnung, wie sie bei Sepsis, Tumoren (z.B. Lungenkarzinome mit

hämatologischen Komplikationen), Verbrennungen und Präeklampsie vorkommen, die Fibrinspaltprodukte. Hier dient die D-Dimer-Bestimmung der Früherkennung und besonders zur Verlaufskontrolle.

Wenn erhöhte D-Dimere im Urin nachgewiesen werden, kann dieses auf Infekte, Glomerulonephritiden und Blasenkarzinome hinweisen. Bei Nierentransplantationen weist ein pathologischer Wert, der sich über längere Zeit hält, auf einen schwierigeren Verlauf hin.

Dennoch kann ein Anstieg der D-Dimerkonzentration auch ohne das Vorliegen eines Thrombus auftreten. Dieses ist vor allem bei der Wundheilung der Fall.

Eine Art der Wundheilungsstörung liegt auch bei zahlreichen malignen Tumoren vor, indem diese von einem Fibrinnetz umgeben werden. Im Fall des Magenkarzinoms konnten auf den Tumorzellen unter anderem die a Untereinheit von Faktor XIII und die Faktoren VII, IX, X und XII, sowie Prothrombin nachgewiesen werden. Es zeigte sich gleichzeitig kein oder nur ein geringes Vorkommen von u-PA und t-PA, jedoch eine hohe Aktivität von PAI im Tumorgewebe. Dieses führt zu einer tumorzellbedingten Aktivierung der extravasalen Gerinnung [111]. Je nach Ausmaß des Tumorwachstums und der Metastasierung steigt die Menge der freigesetzten Fibrinspaltprodukte [98,7]. So dienen die D-Dimere als Verlaufssparameter, da nachgewiesen werden konnte, dass sie mit verschiedenen Tumormarkern korrelieren. Als Beispiel wären hier CEA, CA 125 und CA 15-3 zu nennen [98]. Es wurde gezeigt, dass das Auftreten erhöhter D-Dimerwerte bei Tumorerkrankungen mit einer ungünstigeren Prognose einhergehen [13,35]. Auf Grund der häufig erhöhten D-Dimerkonzentrationen bei Tumorpatienten ist die D-Dimerbestimmung nicht verlässlich bei der Diagnostik venöser Thrombembolien. In diesem Fall sind die Duplexsonographie und das Spiral-CT bzw. die Ventilations-Perfusions-Szintigraphie bei klinischem Verdacht auf eine TVT oder Lungenembolie als Diagnostik vorzuziehen [39].

2.3.3 Ausgewählte Nachweismethoden

Die Bestimmung der Konzentration an D-Dimeren kann im Blut und Harn vorgenommen werden. Für die Untersuchung von Blut wird Citratplasma verwendet, ältere Nachweise benötigen Serum. Zur Harnanalyse muss dieser defibriniert werden, wenn sie mit einem Serumverfahren durchgeführt wird. Seit kürzerer Zeit gibt es auch Tests zur Bestimmung der D-Dimere aus Vollblut [98].

Latex-Agglutination [98,44]

Der Nachweis von D-Dimeren kann über Latex-Agglutination erfolgen. Er wird meist auf Objektträgern oder in Reagenzröhrchen durchgeführt. Hierbei werden Latexpartikel verwendet, die mit monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. Als Antigen wirkt die Quervernetzung der Fibrinspaltprodukte. Dieses Antigen bindet an die auf den Latexpartikeln gebundenen Antikörper. Wenn eine erhöhte Konzentration an D-Dimeren vorliegt kommt es zu einer sichtbaren Agglutination. Jedoch wird durch die Antikörper meist nicht zwischen Fibrinogen- und Fibrinspaltprodukten unterschieden. Dieser Nachweis braucht nur wenig Zeit, ist aber auf Grund seiner geringeren Sensitivität nur als Screeningtest zu verwenden. Jedoch gibt es Verbesserungen durch Verwendung eines automatischen Analysegerätes, wodurch eine genaue Bestimmung der Menge an D-Dimeren erfolgen kann. Zusätzlich eignet sich die Methode auch zur Aufarbeitung größerer Probenzahlen. Dieses kommt bei der Turbidimetrie zum Einsatz.

Enzymimmunoassay [98,44]

Beim Nachweis von D-Dimeren über den Enzymimmunoassay werden Antikörper verwendet, die auf einer Oberfläche gebunden sind. Die in der Probe enthaltenen Spaltprodukte binden an die gebundenen Antikörper. In einem weiteren Schritt wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der mit einem Enzym markiert ist. Dieser bindet nur an das bereits auf der Oberfläche fixierte Antigen. So ist die Menge der gebundenen Antikörper sowie die Menge des Enzyms in äquivalenter Menge zum Antigen der Spaltprodukte vorhanden. Das Enzym setzt ein zugegebenes Substrat um, wobei ein Farbstoff entsteht. Dieser ist äquivalent zur Menge des untersuchten

Antigens und wird photometrisch gemessen. Je nach Spezifität der verwendeten Antikörper werden Fibrinogenspaltprodukte, Fibrinspaltprodukte oder beides erfasst.

2.3.4 Störfaktoren und Interferenzen

Bei defibrinierungspflichtigen Nachweismethoden kann es durch zurückbleibendes Fibrinogen bei Hyperfibrinogenämien und auch Heparintherapien zu Störungen kommen.

Weitere Einschränkungen der Aussagefähigkeit ergeben sich meist durch die Spezifität des jeweiligen Assays.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Ein häufiges in der Labormedizin angewandtes Untersuchungsmedium ist die Blutprobe. Auch bei der Bestimmung der in dieser Arbeit untersuchten Parameter HbA_{1c}, CRP und D-Dimere kommt sie zum Einsatz. Sie wird entweder als Kapillarblut oder aus einer Venenpunktion gewonnen. Der Vorteil der Kapillarblutentnahme besteht darin, dass nur wenige Mikroliter für eine Analyse ausreichen und eine venöse Blutentnahme umgangen werden kann. Aus diesem Grund findet die Kapillarblutentnahme zur Diagnostik auch auf den Gebieten der Pädiatrie und Geriatrie immer häufiger Anwendung.

Die jedoch am häufigsten vorgenommene Blutprobenentnahme ist die Venenpunktion. Schon bei der Punktion wird das Blut durch bereits in den Abnehmeröhrchen vorhandene Antikoagulantien für die Laboruntersuchung vorbereitet.

Als häufigstes zugesetztes Antikoagulanzen wird Ethylendiamintetraacetat (EDTA) eingesetzt. Es bildet stabile Metallkomplexe mit den im Blut vorhandenen Metallionen und entzieht dem Blut so die für die Gerinnung entscheidenden Ca²⁺-Ionen. Für Gerinnungsuntersuchungen wird dagegen zur vorübergehenden Gerinnungshemmung Natriumcitrat verwendet. Es steht mit dem Blut im Verhältnis 1:9 (1ml Na-Citrat : 9ml Probe).

Neben diesen Antikoagulantien finden als Calciumkomplexbildner noch Oxalat (z.B. Na-Oxalat) und Fluorid Verwendung, wobei dem Natriumfluorid als zusätzlicher Glykolysehemmer bei der Blutzuckerbestimmung eine wichtige Rolle zukommt.

Für klinisch-chemische Untersuchungen nutzt man auch die Natrium-, Kalium-, Ammonium- und Lithiumsalze des Heparins.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Geräten ist der Einsatz unterschiedlicher Blutproben möglich. So können zur CRP-Messung beim NycoCard[®]CRP Serum, Plasma und Vollblut sowohl mit als auch ohne Heparin, Citrat oder EDTA benutzt werden, beim Micros[®]CRP jedoch nur mit EDTA ungerinnbar gemachtes Vollblut.

Die HbA_{1c}-Analyse mit dem NycoCard[®]HbA_{1c} kann mit Kapillarblut oder Venenblut mit und ohne EDTA oder Heparin durchgeführt werden. Aus Gründen des direkten

Vergleichs der Geräte, sowie wiederholter Messungen der gleichen Probe, wird bei den nachfolgenden Untersuchungen venöses Vollblut verwendet, welches zur CRP-Messung mit Heparin, zur HbA_{1c}-Messung mit EDTA und zur D-Dimer Bestimmung mit Citrat versetzt wird.

3.2 Bestimmungsmethoden

Zur quantitativen Auswertung aller drei NycoCard Nachweise kann der NycoCard®Reader II eingesetzt werden. Als Farbreflektometer bestimmt er die relative Farbintensität auf der Testkartenoberfläche.

Das Gerät besteht aus dem Gehäuse mit einem Mikroprozessor und dem Lesestift, der drei Lichtquellen der Farben rot, grün und blau enthält. Je nach Probe wird verschiedenfarbiges Licht ausgesendet. Das von der Kartenoberfläche reflektierte Licht wird von Photodioden aufgenommen und mit dem Leerwert (weiße Probe) verglichen. Die Konzentrationsermittlung findet durch den Mikroprozessor anhand einer standardisierten Korrelationstabelle statt.

Zur Messung des CRP und des D-Dimers sendet der Lesestift grünes Licht aus.

Bei der Bestimmung von HbA_{1c} wird blaues und rotes Licht benötigt. Mit dem blauen Licht wird die Gesamtmenge an Hämoglobin gemessen, während das rote nur den blauen, an die Glucose gebundenen Farbstoff erfasst. Somit kann der Prozentsatz von HbA_{1c} am Gesamthämoglobin bestimmt werden.



Abb. 3.1: Nycocard® Reader II

3.2.1 HbA_{1c} Diagnostikgeräte

3.2.1.1 Nycocard® HbA_{1c}



Abb. 3.2: Nycocard® HbA_{1c} Test Kit

Testprinzip

Dieser Test erfasst den prozentualen Anteil von glykolysiertem Hämoglobin am Gesamthämoglobin. Mit einer Kapillare werden 5µl Kapillarblut oder EDTA- bzw. Heparin-Vollblut mit der vorportionierten Reagenzlösung R1 vermischt. Das Reagenz enthält einen Glykinamidpuffer, Zn²⁺-Ionen, Detergentien und mit Farbstoff gekoppelte Borsäure. Durch die Detergentien werden die Blutzellen lysiert und

sämtliches Hämoglobin wird frei. An das cis-Diol des Glykohämoglobins bindet dabei die farbgekoppelte Borsäure. Nach einer Inkubationszeit von 2-3min werden 25µl der gut durchmischten Probe auf die Filtermembran der Testkassette aufgebracht. Auf der Oberfläche der Membran befinden sich dann sowohl Hämoglobin, als auch markiertes Glykohämoglobin. Anschließend wird ungebundene Borsäure durch Waschen mit der Waschlösung R2 bestehend aus morpholingeputterter NaCl-Lösung und Detergentien von der Membranoberfläche in tiefere Schichten der Membran transportiert. Somit kann ungebundenes Konjugat nicht an der Oberfläche zurückbleiben und das Messergebnis verfälschen. Das Reagenz R2 sollte mindestens 10s einwirken.

Die Auswertung erfolgt mit dem NycoCard® Reader II durch Reflektionsphotometrie. Mit einer blauen Lichtquelle wird die Intensität des roten Blutfarbstoffes, dem physiologischen Hämoglobin, und mit einer roten Lichtquelle die des blauen Farbstoffes, mit welchem das HbA_{1c} markiert ist, gemessen. Die errechneten Konzentrationswerte werden vom Mikroprozessor des Lesegerätes zueinander in Relation gesetzt und die HbA_{1c} Menge wird in Prozent des Gesamthämoglobins angegeben.

Im Gegensatz zum NycoCard® CRP-Nachweis muss bei diesem Test die Auswertung mit dem Lesegerät NycoCard® Reader II erfolgen, da die Menge an HbA_{1c} immer in Relation zum Gesamthämoglobingehalt angegeben wird. Eine rein visuelle Auswertung ist hier nicht möglich.

Probenmaterial

Der Nachweis eignet sich für Kapillarblut und venöses Vollblut. Dieses kann nativ, aber auch mit EDTA oder Heparin antikoaguliert sein.

Messbereich

Der Messbereich dieses Testsystems liegt nach Angabe des Herstellers in einem Bereich von 3-18% HbA_{1c}.

Normbereich

Der Normbereich für HbA_{1c} Konzentrationen beträgt für diesen Nachweis 4,5-6,3%.

Kontrolle

Die Kontrolle von Reagenzien und Nachweis auf ihre Funktionsfähigkeit erfolgt mit Hilfe eines speziell vom Hersteller angebotenen Kontrollmaterials.

Spezifität

Der Nachweis ist spezifisch für das Gesamtglykohämoglobin. Die HbA_{1c} Konzentration wird errechnet.

Präzision

Der Variationskoeffizient liegt im gesamten Messbereich unter 5%.

3.2.1.2 Variant II**Testprinzip**

Der Variant II ist ein Analysensystem zur Untersuchung von Hämoglobinen. Diese werden nach ihren Fraktionen aufgetrennt und es wird der jeweilige prozentuale Anteil am Gesamthämoglobin angegeben.

Für die Bestimmung von speziellen Hämoglobinfractionen gibt es jeweils einen Testkit, der auf die entsprechende Fraktion abgestimmt ist.

Das Testprinzip basiert auf der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). Als Probenmaterial wird EDTA Blut benötigt, welches bei 2-8°C bis zu sieben Tage aufbewahrt werden kann. Zur Analyse müssen die Proben vorher nicht aufgearbeitet oder vorbereitet werden. Sie werden vom Gerät pipettiert und in der Probenstation automatisch gemischt und verdünnt. Die verwendete Verdünnungslösung besteht aus einem BIS-TRIS Puffer mit einem pH Wert von 6,6 und Natriumazid als Konservierungsmittel. Anschließend wird die Probe in die zweite Station, die Chromatographiestation, injiziert. Diese besteht aus zwei Doppelkolbenpumpen, einer analytischen Säule und einem Detektor. Die Doppelkolbenpumpen befördern einen Puffer mit steigender Ionisation durch die Chromatographiesäule. Dadurch können die verschiedenen Hämoglobine durch ihre unterschiedlichen Ionisationsformen voneinander getrennt werden. Die getrennten Hämoglobingruppen

werden einem Doppelwellenlängen-Detektor zugeführt. Dieser erfasst bei einer Wellenlänge von 415nm die durch die Hämoglobine ausgelösten Absorptionsänderungen. Durch eine zweite Messung bei 690nm wird erreicht, dass das Hintergrundrauschen minimiert wird.

Die gewonnenen Absorptionen werden mittels der Clinical Data Management (CDM) Software ausgewertet und das Ergebnis als Chromatogramm dargestellt, wobei die Absorption gegen die Zeit dargestellt ist. Der HbA_{1c} Peak wird über einen modifizierten gaußschen Algorithmus ermittelt und das Ergebnis getrennt von den Peaks des labilen Glykohämoglobins und carbamylierten Hämoglobins dargestellt.

Probenmaterial

Der Variant II benötigt zur Bestimmung des HbA_{1c} EDTA-Vollblut.

Messbereich

Der Nachweis erfasst HbA_{1c} Konzentrationen in einem Bereich von 1,3-18,9%.

Normbereich

Der Normbereich gilt für HbA_{1c} Werte <6% .

3.2.2 CRP Diagnostikgeräte

3.2.2.1 NycoCard[®] CRP Whole Blood



Abb. 3.3: NycoCard[®] CRP Reagenzien



Abb. 3.4: NycoCard[®] Testkarte

Testprinzip

Bei dem NycoCard®CRP Whole Blood System handelt es sich um einen immunometrischen Test in Form eines Sandwich-Enzym-Immuno-Assays. 25 µl der mit EDTA versetzten Blutprobe werden in ein mit 1ml Verdünnungslösung (R1) vorgefülltes Eppendorfgefäß pipettiert. Die Verdünnungslösung besteht aus einem Boratpuffer mit einem pH von 9,0 sowie Detergentien zur Zelllyse. Nach 10s kräftigen Mischens und einer Ruhezeit von 45s werden 25µl der verdünnten Probe auf eine Membran aufgetragen, die mit stationären spezifischen Antikörpern beschichtet ist. An diese bindet in der Lösung vorhandenes CRP. Danach wird die Membran mit der Konjugatlösung (R2), die phosphatgepufferte monoklonale goldmarkierte Antikörpern gegen CRP enthält, überschichtet. Es bildet sich nun ein Sandwich in Form von Antikörper(stat.)-CRP-Antikörper(Au-mark.) aus. Alle ungebundenen goldmarkierten CRP-Antikörper werden danach mit der Waschlösung (R3) aus phosphatgepufferter NaCl-Lösung mit Detergentienzusatz entfernt. Nach 20 bis 30s ist die in der Reaktion entstandene Farbe stabil und das Ergebnis kann innerhalb von 5min abgelesen werden.

Zur Positivkontrolle steht mitgeliefertes Humanserum unterschiedlicher Konzentration zur Verfügung.

Die Ergebnisauswertung kann semiquantitativ durch Vergleich der Färbung mit einer Referenzkarte erfolgen oder quantitativ mit dem NycoCard®Reader II. Die Farbreferenzkarte besitzt fünf Felder, welche Werte zwischen 10 und 200 mg/l wiedergeben. Die Messung durch das Lesegerät erfolgt durch Aussendung grünen Lichts, das vom entstandenen Farbstoff absorbiert wird. Mit einem Reflektionsphotometer wird die reflektierte Lichtmenge gemessen. Aus dem direkt proportionalem Zusammenhang von Lichtabsorption und Menge der markierten monoklonalen Antikörper errechnet der Mikroprozessor die Konzentration an C-reaktivem Protein.

Ein zu hoher Hämatokritwert kann das Ergebnis verfälschen. Aus diesem Grund gibt der Hersteller des Messsystems bei Werten über 50% eine Korrekturtabelle mit folgenden Multiplikationsfaktoren an:

Hkt [%]	50	55	60	65	70	75	80
Faktor	1,2	1,3	1,5	1,7	2,0	2,4	3,0

Probenmaterial

Für die Bestimmung des C-reaktiven Proteins kann Kapillarblut oder venöses Vollblut verwendet werden. Das Blut kann sowohl ohne Antikoagulanzen, als auch mit Heparin, Citrat oder EDTA untersucht werden.

Messbereich

Der Messbereich des NycoCard® CRP liegt zwischen 10mg/l und 200mg/l. Wenn die Auswertung der Farbreaktion nicht semiquantitativ erfolgt, sondern quantitativ mit dem NycoCard® Reader II liegen die Messintervalle bei 1mg/l.

Kontrolle

Die Kontrolle der Messgenauigkeit wird mit Hilfe von Positivkontrollen aus Humanserum durchgeführt und sind jedem Kit von Reagenzien vom Hersteller beigelegt.

Spezifität

Die Bestimmung des C-reaktiven Proteins erfolgt über spezifische monoklonale Antikörper. Jedoch ist das Auftreten von Kreuzreaktionen nicht auszuschließen.

Präzision

Die in der Produktbeschreibung angegebene Genauigkeit wird mit einer CV von 5-8% im Labor und außerhalb eines Labors mit einer CV von bis zu 15% angegeben.

Störfaktoren

Hierzu gehören Luftblasen auf der beschichteten Membran, falsche Pipettier Volumina oder eine unvollständige Hämolyse, die durch eine Temperatur des

Reagenz R1 außerhalb des Bereichs von 15-25°C oder zu kurze Einwirkzeit hervorgerufen werden kann.

3.2.2.2 Micros CRP



Abb. 3.5: Micros CRP

Funktionsprinzip

Mit dem Micros CRP kann neben einer CRP-Bestimmung auch ein Differentialblutbild erstellt werden. Dabei kommen verschiedene Messmethoden zum Einsatz. Die hämatologischen Untersuchungen beruhen auf Impedanzmessung und Spektralphotometrie, wohingegen die CRP-Messung durch Immunturbidimetrie erfolgt.

Bei der Konzentrationsbestimmung des C-reaktiven Proteins wird eine mit EDTA ungerinnbar gemachte Vollblutprobe verwendet. Dieses Vollblut wird durch Zusatz von Saponin in Form von Reagenz R1 lysiert. Um später Kreuzreaktionen mit dem spezifischen Antikörper zu vermeiden, werden durch das Reagenz R2 Partikel gebunden, die als unspezifisches Antigen wirken können. Für die spezifische Bindungsreaktion werden mit dem Reagenz R3 CRP sensibilisierte Latexpartikel zugegeben. Das bedeutet, dass die Latexpartikel mit einer Schicht spezifischer Anti-CRP-Antikörper überzogen sind, welche mit ihrem F_c-Teil an die Oberfläche der

Partikel gebunden sind. Das in der Probe vorhandene C-reaktive Protein bindet nun an den F_{ab} –Teil der gebundenen Antikörper. Mit zunehmender CRP-Konzentration entsteht eine vermehrte Vernetzung zwischen Proteinen und Latexpartikeln. Das von einer Leuchtdiode ausgesandte Licht der Wellenlänge 850 nm wird von diesem Netz absorbiert. Gegenüber der Leuchtdiode befindet sich ein optischer Sensor, der die Lichttransmission misst. Diese ist indirekt proportional zur Konzentration des C-reaktiven Proteins in der Blutprobe.

Zur hämatologischen Untersuchung der zellulären Blutbestandteile wird die Blutprobe verdünnt und in eine flüssigkeitsgefüllte Messkammer aspiriert, die an zwei gegenüberliegenden Seiten je eine Elektrode besitzt. Zwischen diesen beiden Elektroden fließt ein konstanter elektrischer Strom. Wenn durch die Zugabe des Analysats Blutzellen zwischen die Elektroden in den Stromfluss gelangen, steigt der Widerstand in Abhängigkeit vom Zellvolumen. Um zu verhindern, dass Zellen mehrfach registriert werden, wird die Kammer von einem ständigen Strom an Verdünnungslösung durchspült.

Auf diese Weise werden die Erythrozyten und Thrombozyten erfasst. Zur Analyse von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten wird die Probe mit dem ABX MINIDIL LMG Reagenz behandelt, so dass die weißen Blutzellen schrumpfen und so besser differenziert werden können. Die Bestimmung des Hämoglobingehaltes erfolgt nach Zelllyse mit dem Reagenz ALPHALYSE durch Spektralphotometrie mit Licht der Wellenlänge 530nm.

Probenmaterial

Für die Bestimmung des CRP eignet sich in erster Linie EDTA Vollblut, aber auch Heparin, Natriumcitrat, Natriumfluorid und Na-Oxalat eignen sich als Antikoagulanzen.

Messbereich

Der Messbereich des Micros[®] CRP liegt zwischen 0,2 und 10 mg/dl. Bei höheren Konzentrationen kann die Probe verdünnt werden und unter Einbezug des Hämatokrits das Ergebnis ermittelt werden.

Kontrolle

Vom Hersteller ABX Diagnostics werden Positivkontrollen für den Micros[®] CRP geliefert, mit denen die Funktionsfähigkeit des Assays überprüft werden kann.

Präzision

Der Variationskoeffizient liegt bei der Präzisionsmessung bei CV = 10%.

3.2.2.3 Tina-quant[®] CRP /Hitachi 917

Testprinzip

Das Testprinzip beruht auf der turbidimetrischen Messung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Als Probenmaterial dient Serum aus einem Ammoniumheparinat-Röhrchen. Dieses wird vom Hitachi Gerät automatisch pipettiert und die Lösung R1 zugegeben. Das Reagenz R1 besteht aus einem TRIS/HCl-Puffer mit NaCl, Polyethylenglykol sowie Konservierungsmitteln. Der pH-Wert beträgt 7,5. Anschließend wird das Reagenz R2 zugegeben, welches gegen menschliches CRP gerichtete Antikörper der Ziege beinhaltet. Diese Antikörper sind in einem Puffer gelöst, welcher die gleiche Zusammensetzung wie R1 hat. Sie bilden mit dem in der Probe befindlichen C-reaktiven Protein einen Antigen-Antikörper-Komplex. Die durch diese Reaktion hervorgerufene Trübung der Lösung wird turbidimetrisch erfasst. Der Zusatz von Polyethylenglykol in beiden Reagenzien beschleunigt die Reaktion und führt so zu einer schnelleren Erfassung der CRP Konzentration.

Probenmaterial

Als Untersuchungsmaterial dient beim Hitachi 917 Serum, sowie EDTA-Plasma oder Heparinat-Plasma.

Messbereich

Der Messbereich liegt zwischen 3mg/l und 240mg/l. Bei höheren Werten besteht die Möglichkeit der Verdünnung mit 0,9%iger Natriumchloridlösung.

Normbereich

Als im Referenzbereich liegend werden Messwerte $< 5,0\text{mg/l}$ betrachtet.

Nach Bewertung des Herstellers schließen Ergebnisse $< 1,0\text{mg/l}$ akute entzündliche Prozesse weitgehend aus, Werte zwischen $1,0\text{--}5,0\text{mg/l}$ sprechen für leichte bis mäßige entzündliche Erkrankungen und Werte $> 5,0\text{mg/l}$ deuten auf einen ausgedehnten entzündlichen Prozess hin.

Kontrolle

Zur Kontrolle der Richtigkeit des Tests werden verschiedene Materialien verwendet. Precinorm Protein und Precipath Protein sind geeignete Kontrollmaterialien, aber es können auch andere geeignete verwendet werden.

3.2.3 D-Dimer-Diagnostikgeräte

3.2.3.1 NycoCard[®] D-Dimer



Abb. 3.6: NycoCard[®] D-Dimer Reagenzien **Abb. 3.7:** NycoCard[®] D-Dimer Testkarte

Testprinzip

Der Test beruht auf einem Sandwichenzymimmunoassay und besteht im Wesentlichen aus einer Testkarte, einer Konjugat- und einer Waschlösung. Vor der Durchführung des Tests muss die Probe für 15 min mit 3000 min^{-1} zentrifugiert

werden. Das so gewonnene Plasma wird für den Test verwendet. Im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit behandelten Parametern existiert für die Bestimmung der Fibrinspaltprodukte kein Nachweis, bei dem eine Messung aus Vollblut erfolgen kann.

Die Testkarte besitzt sechs Vertiefungen, deren Boden von einer Filtermembran gebildet wird. Diese ist mit monoklonalen Antikörpern gegen D-Dimere beschichtet. Zu Beginn der Testdurchführung werden 50µl Waschlösung aufgetragen, welche aus einem Puffer mit einem pH-Wert von 8,0, BSA und Detergentien besteht. Danach werden ebenfalls 50µl des Probenplasmas auf die Vertiefung pipettiert. Die Probe durchdringt die Membran, wobei die darin enthaltenen D-Dimere durch die Antikörper auf der Filteroberfläche gebunden werden. Um die gebundenen D-Dimere sichtbar und quantifizierbar zu machen werden 50µl der Konjugatlösung zugegeben. In dieser gepufferten Lösung befinden sich Antikörper gegen die D-Dimerstruktur. Um diese später auch erfassen zu können sind sie mit Goldpartikeln markiert. Aufgetropft auf die Kartenoberfläche binden die Antikörper an den bereits fixierten D-Dimermolekülen und führen somit zur Ausbildung eines sogenannten Sandwiches. Die Testkartenoberfläche verfärbt sich durch das Konjugat rotbraun. Überschüssiges Konjugat wird durch Auftragen von 50µl Waschlösung von der Oberfläche entfernt. Die verbleibende Färbung der Membran ist direkt proportional zur Menge der gebundenen D-Dimere.

Die Ermittlung der D-Dimerkonzentration kann mittels einer Farbreferenzkarte erfolgen. Bei der Auswertung der Ergebnisse für diese Arbeit wurde wegen der größeren Genauigkeit der NycoCard® Reader II verwendet.

Probenmaterial

Die D-Dimer Bestimmung mit diesem Nachweis erfordert plättchenfreies Citratplasma.

Normbereich

Als Normwerte für die D-Dimerkonzentration im Plasma werden vom Hersteller Werte unter 0,3mg/l angegeben.

Kontrolle

Zur Kontrolle der Testreagenzien, sowie der Testhandhabung wird vom Hersteller eine Positivkontrolle mitgeliefert.

Spezifität

Die in dem Test zum Einsatz kommenden Antikörper sind monoklonal und spezifisch für ein Neo-Antigen der D-Dimere, wodurch eine Kreuzreaktion durch Fibrinogen und Fibrinmonomere vermieden wird.

3.2.3.2 Turbiquant[®] D-Dimer



Abb. 3.8: Turbitimer

Testprinzip

Der Nachweis von D-Dimeren erfolgt bei diesem Test als turbidimetrische Bestimmung. Als Untersuchungsmaterial dient hier ebenfalls Citratplasma. Von diesem werden 100µl in eine, für das Analysengerät spezielle und in diesem schon platzierte, Küvette pipettiert. Danach werden 500µl des Reagenz Turbiquant[®] D-Dimer hinzugegeben. Dieses Reagenz enthält monoklonale Antikörper gegen D-Dimere. Als Befestigungs- und Trägermedium dienen Polystyrolpartikel. Diese antikörperbeschichteten Teilchen gehen mit den D-Dimermolekülen im Citratplasma Antigen-Antikörper-Komplexe ein, wodurch in der Reagenzküvette eine Trübung

entsteht. Diese wird vom Analysengerät Turbitimer® photometrisch erfasst und ausgewertet. In die Auswertung fließen die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, die Reaktionszeit, sowie die Reaktionstemperatur ein. Anhand eines Vergleichs mit Referenzwerten kann das Gerät die Konzentration an D-Dimeren in der Probe ermitteln.

Probenmaterial

Bei diesem Nachweis erfolgt die Bestimmung der D-Dimere aus Citratplasma.

Messbereich

Der Messbereich dieses Nachweises reicht von 200 bis 7 000 µg/l

Normbereich

Als pathologischer Grenzwert werden bei diesem Assay 250 µg/l angegeben.

Kontrolle

Zur Kontrolle des Nachweises stehen vom Hersteller zwei Seren zur Verfügung, die unterschiedliche Abschnitte des Messbereichs abdecken. Die erhaltenen Kontrollergebnisse sollten dem Sollwert entsprechen oder im Konfidenzintervall von +/-20% liegen.

Spezifität

Nach Angaben des Herstellers liegt eine Spezifität für quervernetzte Fibrinspaltprodukte vor.

Fehlerquellen

Bei einer Eigentrübung der Probe z.B. durch Proteine kann es zu fehlerhaften Bestimmungen kommen. Durch Zentrifugieren ist es häufig möglich diese Trübung zu verringern oder zu entfernen. Falsche Ergebnisse können auch durch unspezifische Reaktionen oder Interaktionen mit Rheumafaktoren auftreten.

3.2.3.3 Mini VIDAS®

Testprinzip

Dem miniVIDAS Nachweis liegt das Prinzip eines Sandwichenzymimmunoassays zugrunde. Im Gegensatz zu oben beschriebenen Methoden entsteht zur Quantifizierung kein Farbstoff, sondern eine fluoreszierende Verbindung, welche ebenfalls photometrisch erfasst wird.

Alle für den Test notwendigen Substanzen befinden sich im DD2 Reagenzienriegel. Im ersten Schritt wird die Probe automatisch in eine Reaktionsküvette pipettiert, in der sich eine Konjugatlösung mit alkalischer Phosphatase markierten monoklonalen Mausantikörper befindet. Neben den Immunglobulinen enthält das Konjugat Pferdeserum, TRIS Puffer mit einem pH von 6,5 sowie Natriumazid. Die Reaktionsküvette beinhaltet zusätzlich einen mit anti-D-Dimerantikörpern beschichteten Festphasenrezeptor, so dass sich durch die Zugabe von Probe und Konjugat ein Sandwich bilden kann. Der Inhalt der Küvette wird durch das Gerät mittels mehrfacher Aspiration vermischt. Nachdem alle Bindungsstellen des D-Dimers mit Konjugat besetzt sind, erfolgen mehrere Waschvorgänge, um ungebundene Partikel zu entfernen. Dafür steht in einer Küvette des Riegels ein Waschpuffer zur Verfügung, welcher aus TRIS Puffer, chemischen Stabilisatoren und Natriumazid besteht. Zum Nachweis wird durch die alkalische Phosphatase, ein Substrat, das Diäthanolamin und Natriumazid enthält, umgesetzt. Hierbei wird 4-Methyl-umbelliferyl-phosphat zu 4-Methyl-umbelliferon umgesetzt. Dieses Produkt der Reaktion fluoresziert und wird durch das Gerät bei 450 nm photometrisch erfasst. Hierbei entspricht der Grad der Fluoreszenz der Menge an D-Dimeren in der Probe. Das miniVIDAS® Gerät vergleicht die gemessenen Daten mit zwei gespeicherten Eichkurven und errechnet daraus die Konzentration an D-Dimeren in der untersuchten Probe.

Probenmaterial

Wie bei den anderen D-Dimer Bestimmungsmethoden wird beim miniVIDAS® Citratplasma verwendet.

Messbereich

Die untere Nachweisgrenze für die Bestimmung von D-Dimeren liegt beim miniVIDAS® bei 45ng/ml. Je nach Testkit liegt die obere Grenze bei 5000ng/ml oder 10000ng/ml. Bei Werten über diesen Grenzen muss die untersuchte Probe verdünnt werden.

Normbereich

Als nicht pathologisch werden D-Dimer Konzentrationen unter 500µg/l eingestuft.

Kontrolle

Zur Überprüfung der Reagenzien werden vom Hersteller zwei Kontrollen in jedem VIDAS DD2 Kit mitgeliefert.

Präzision

In verschiedenen Konzentrationsbereichen variiert der Variationskoeffizient der Präzisionsmessung zwischen 3,9 und 5,3%

3.3 Versuchsdurchführung

Alle Proben stammten aus der täglichen Laborroutine des Zentrallabors des Universitätsklinikums Frankfurt/Main. Die Untersuchungen der Proben mit den etablierten Labormethoden (Variant II, Tina-quant® CRP/ Hitachi 917, miniVIDAS) wurden im Routineprogramm von einer Medizinisch-Technischen-Assistentin vorgenommen. Die Messungen mit den Point-of-Care Geräten, die in dieser Arbeit betrachtet werden, sind von mir persönlich durchgeführt worden. Die Testdurchführung erfolgte streng nach den Vorschriften der Hersteller. Zur Sicherstellung der einwandfreien Funktion der Tests wurden regelmäßig und bei Reagenzienwechsel zusätzlich die vom Hersteller des Nachweises empfohlenen Kontrollmessungen vorgenommen. Weiterhin ist die Präzision der verwendeten Geräte bzw. Assays durch zehnfache aufeinanderfolgende Messung einer im Normbereich befindlichen Probe ermittelt worden.

3.3.1 HbA_{1c} - Messung

Zur Bestimmung der Konzentration von Glykohämoglobinen kam sowohl beim Variant II, als auch beim NycoCard[®]HbA_{1c} venöses Vollblut zum Einsatz. Als Probenbehältnisse wurden EDTA-Blutentnahmeröhrchen der Firma Sarstedt benutzt. Die benötigten Proben stammten aus der Gesamtheit der zur Bestimmung des HbA_{1c}-Wertes in das Labor gelieferten Patientenproben. Die Diagnostik der Proben erfolgte beim Variant II gemäß der im Labor etablierten Routine. Nachdem die Proben die Labordiagnostik durchlaufen hatten, wurden sie mit dem NycoCard[®]HbA_{1c} untersucht. Die Bestimmung erfolgte binnen 48 Stunden, wobei die Proben bis dahin bei +4°C in einem speziell dafür vorgesehenen Gerät gekühlt wurden.

Zur Versuchsdurchführung wurden die Proben bei Zimmertemperatur resuspendiert. Danach sind die HbA_{1c}-Bestimmungen mit dem NycoCard[®]HbA_{1c} nach Vorschrift und in den Schritten wie oben beschrieben durchgeführt und die Ergebnisse beider Geräte in einer Excel[®] Tabelle notiert worden.

3.3.2 CRP – Messung

Als Standardbestimmungsmethode für das C-reaktive Protein ist der Nachweis durch das im Zentrallabor eingesetzte Tina-quant[®]CRP/ Hitachi 917 System eingesetzt worden. Vergleichend dazu erfolgte die Bestimmung mit dem Micros[®]CRP und dem NycoCard[®]CRP. Zur Messung dienten hier die täglichen Patientenblutproben des Zentrallabors. Die Proben befanden sich in Ammoniumheparinat-Röhrchen von Sarstedt und wurden ebenfalls bis zur weiteren Untersuchung in einem geeigneten Kühlgerät bei +4°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Konzentration an C-reaktivem Protein durch das Micros[®]CRP wurde das Specimen in entleerte EDTA-Röhrchen der Firma Sarstedt umgefüllt, um die Probenhalter des Gerätes passend bestücken zu können, da die Ammoniumheparinat-Röhrchen von Sarstedt nicht in die vorgebohrten und codierten Halterungen passten.

Ergebnisse, die den Messbereich überschritten, wurden gemäß der Beschreibung im Users Manual von ABX mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt und nach vorgegebener Formel unter Einbeziehung des Hämatokrits neu berechnet.

Die durch das NycoCard®CRP erfassten Werte sind ohne weitere Umrechnung in der Tabelle aufgeführt, da bei allen Werten, die in die endgültige Auswertung aufgenommen wurden, der Hämatokrit im vorgegebenen Bereich lag. Somit mussten keine weiteren Korrekturfaktoren einfließen.

Zur Präzisionsbestimmung der Point-of-Care Geräte ist eine zuvor vom Hitachi ermittelte Probe, die im unteren Messbereich lag, verwendet worden. Mit dieser wurde der Nachweis je zehnmal durchgeführt und anschließend ausgewertet.

3.3.3 D-Dimer Messung

Die Bestimmung der Konzentration an Fibrinspaltprodukten erfolgte unter Verwendung von Plasma. Daher wurden zur Blutentnahme für diesen Nachweis, wie für die meisten übrigen Gerinnungsparameter, Röhrchen der Firma Sarstedt verwendet, welche schon mit Citrat gefüllt waren. Um das Citratplasma zu erhalten, wurden die Proben 15 Minuten bei 3000 min^{-1} zentrifugiert. Direkt im Anschluss daran wurde das Plasma für alle Nachweise pipettiert. Bei dieser Testreihe sind die Proben innerhalb kürzester Zeit verarbeitet worden, um die Stabilität der Fibrinspaltprodukte zu gewährleisten.

Während der Durchführung der Testreihe, wurde durch den Hersteller des Referenzgerätes miniVIDAS eine Softwareumstellung vorgenommen. Die Folge war eine Erweiterung des Messbereiches von maximal 5mg/l auf maximal 10mg/l. Die Eigenschaften des Nachweises haben sich dadurch nicht verändert.

3.4 Statistische Methoden

Alle gewonnenen Ergebnisse der verschiedenen Messreihen sind zur statistischen Auswertung in Excel[®] Tabellen übertragen worden. Für jeden der drei Laborparameter wurde eine Wertetabelle aller verwertbaren Messwerte der beteiligten Geräte erstellt. Diese Wertetabellen wurden mit Hilfe des Programms BiAS[®].7.07-2003 [1] folgenden statistischen Untersuchungen unterzogen:

Schätzgrößen

Im ersten Schritt sind für alle gültigen Fälle n das arithmetische Mittel, die Standardabweichung, der Standardfehler und der Variationskoeffizient berechnet worden.

Test auf Normalverteilung

Für die weitere Untersuchung der Daten ist entscheidend zu wissen, ob sie sich an eine theoretisch zu erwartende Verteilung wie die Gauß'sche Normalverteilung annähern, um geeignete Tests anwenden zu können.

Aus diesem Grund wurden alle Datensätze sowohl dem Kolmogorow-Smirnov-Test (K-S-Test) für kontinuierliche Werte, als auch dem Chi-Quadrat-Test für diskrete, nicht kontinuierliche Werte unterzogen.

Spearman's Rang Korrelation

Zur Überprüfung der Abhängigkeit zweier Zufallsvariablen ist die Korrelation über Spearman's Rang Korrelation bestimmt worden.

Wilcoxon-Test

Zur Prüfung der Messreihen auf gleiche Verteilung wurde der Wilcoxon-Test für verbundene, nicht-normalverteilte Stichproben angewendet, da eine Normalverteilung aller Stichproben, Grundgesamtheiten und Paardifferenzen auf Grund der durchgeführten Tests nicht angenommen werden konnte.

Methodenvergleiche

Zur Untersuchung der Äquivalenz der verschiedenen Nachweise sind Methodenvergleiche in Form des Verfahrens nach Bland und Altman, sowie der Passing-Bablok-Regression durchgeführt worden.

Beurteilung diagnostischer Tests

Zur Beurteilung der Nachweise in ihrer Funktion als diagnostische Tests wurden Spezifität, Sensitivität, positive und negative Likelihood-Ratio mittels der Vierfeldertafel bestimmt, wobei das Referenzgerät als Standard gesetzt wurde. Dieser Test wurde nur für die HbA_{1c}- und D-Dimer-Assays durchgeführt, da bei den CRP-Nachweisen alle Messwerte im pathologischen Bereich lagen.

3.5 Graphische Darstellung

Zur graphischen Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel[®] der Firma Microsoft[®], sowie BiAS[®].7.07-2003 [1] verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 HbA_{1c} Messergebnisse

4.1.1 NycoCard[®] HbA_{1c}

Um einen besseren Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen wurde auf Grund der verschiedenen Normbereiche der Assays Variant II (<6,0%) und NycoCard[®] HbA_{1c} (<6,3%) ein Korrekturfaktor von -0,3% für den NycoCard[®] HbA_{1c} Nachweis eingeführt.

Die Verteilung der Messwerte ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die ermittelten Werte des NycoCard[®] HbA_{1c} sind in Abhängigkeit der Referenzwerte des Variant II aufgetragen.

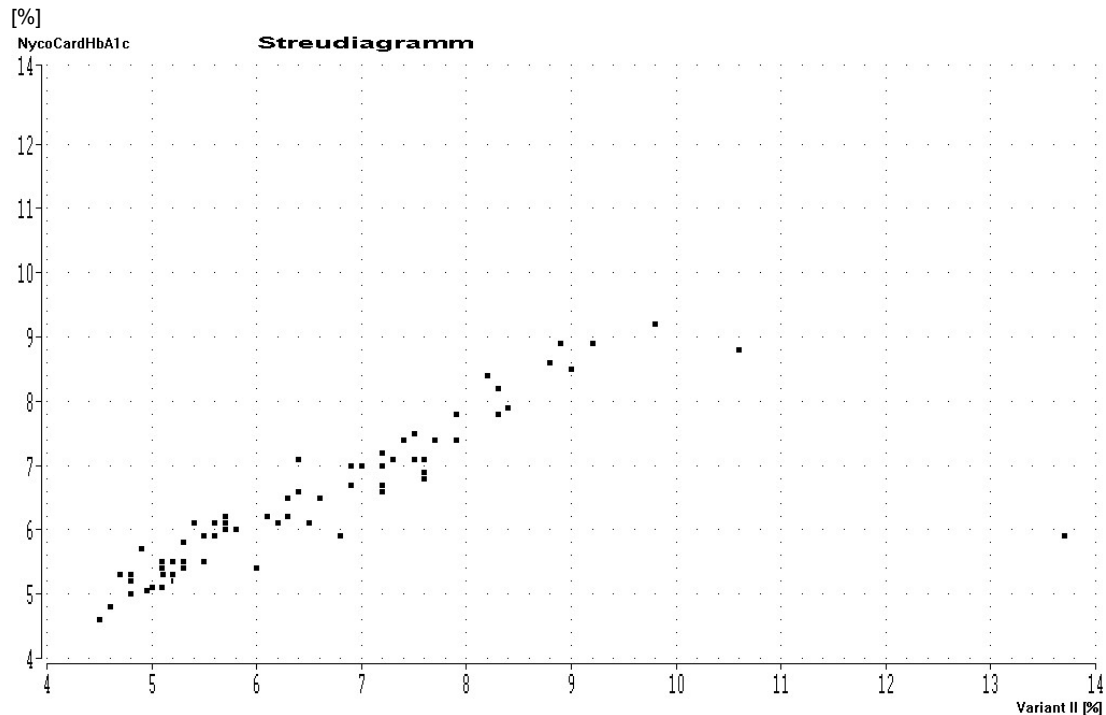


Abb. 4.1: Messwertverteilung NycoCard[®] HbA_{1c}

Für den gesamten Messbereich ergibt sich für das Referenzgerät Variant II ein Mittelwert von $\bar{x} = 6,74\%$, eine Standardabweichung $\sigma = 1,8562$, ein Standardfehler des Mittelwertes von $SEM = 0,2268$ und einen Variationskoeffizienten von $CV = 0,2755$. Beim Testgerät NycoCard[®] HbA_{1c} beträgt der Mittelwert $\bar{x} = 6,59\%$, die Standardabweichung $\sigma = 1,3848$, der Standardfehler des Mittelwertes $SEM = 0,1692$ und der Variationskoeffizient $CV = 0,2102$.

Beim K-S-Test sprechen $P(\text{VariantII}) = 0,02848$ und $P(\text{NycoCard}^{\text{®}} \text{HbA}_{1c}) = 0,0053$ für eine signifikante Abweichung der Stichproben und Grundgesamtheit von einer Normalverteilung.

Im Chi-Quadrat-Test ergeben sich Wahrscheinlichkeiten von $P(\text{VariantII}) = 0,0000$ und $P(\text{NycoCard}^{\text{®}} \text{HbA}_{1c}) = 0,0000$ für das Zutreffen der Nullhypothese einer Normalverteilung.

Auf Grund dieser Ergebnisse wird die Nullhypothese abgelehnt und von einer nicht normalverteilten Datenmenge ausgegangen.

Bei der Berechnung der Spearman's Rang Korrelation ergibt sich zwischen Variant II und NycoCard[®] HbA_{1c} ein Korrelationskoeffizient von $R = 0,9252$ mit einer zweiseitigen Signifikanz von $P = 0,0000$.

Im Wilcoxon-Test für nicht normalverteilte, verbundene Stichproben ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von $P = 0,6062$ für das zufällige Zustandekommen der gemessenen Paardifferenzen.

Methodenvergleiche

Beim Methodenvergleich mittels Passing-Bablok-Regression liegen weder $b = 1$, noch $c = 0$ im Konfidenzintervall, womit die Nullhypothese der Äquivalenz beider Methoden verworfen werden muss.

Bland-Altman's Methodenvergleich hingegen spricht mit $P = 0,2429$ für ein zufälliges Auftreten der Differenzen zwischen beiden Methoden, womit sie als äquivalent betrachtet werden.

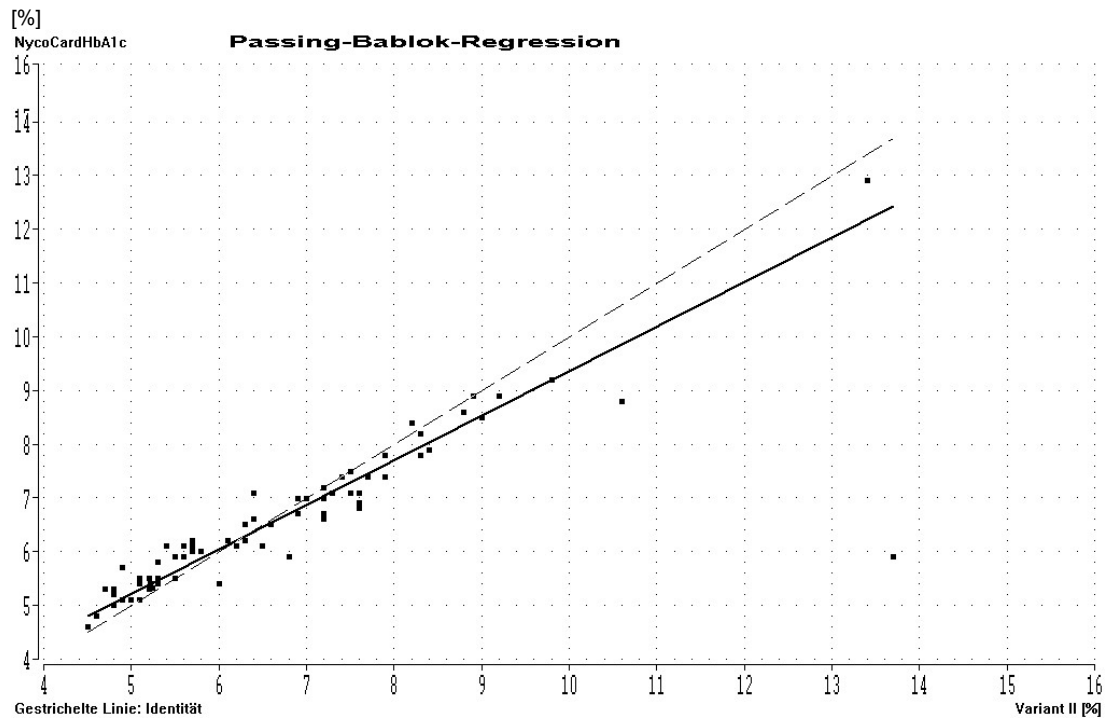


Abb. 4.2: Passing-Bablok-Regression NycoCard[®] HbA_{1c} – Variant II

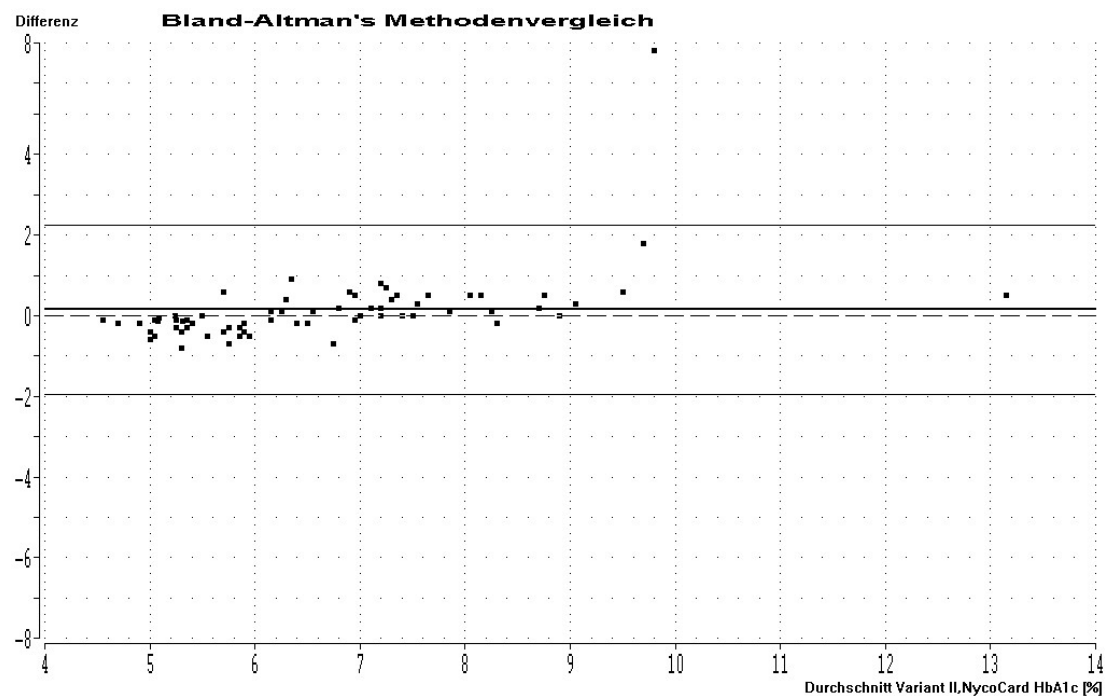


Abb. 4.3: Bland-Altman's Methodenvergleich NycoCard[®] HbA_{1c} – Variant II

Beurteilung diagnostischer Tests

Die Untersuchung der Messergebnisse mittels Vierfeldertafel und Berücksichtigung der verschiedenen Normbereiche ergab für den Nachweis NycoCard[®] HbA_{1c} eine

Sensitivität = 92,31%, eine Spezifität = 78,57%, eine positive Likelihood-Ratio = 4,3077, sowie eine negative Likelihood-Ratio = 0,0979.

Präzisionsmessung

Für die Präzisionsmessung des NycoCard[®] HbA_{1c} ergibt sich ein Mittelwert von $\bar{x} = 6,23\%$ und eine Standardabweichung von $\sigma = 0,1494$. Die Varianz beträgt 0,0240. Der Kolmogoroff-Smirnoff-Test gibt mit $P > 0,20$ und der Chi²-Test mit $P = 0,8664$ eine Normalverteilung der Präzisionsmesswerte an.

4.2 CRP Messergebnisse

4.2.1 NycoCard[®] CRP

Die Abbildung 4.4 zeigt die Messwertverteilung des NycoCard[®] CRP in Abhängigkeit von den Messwerten des Tina-quant[®] CRP/Hitachi 917.

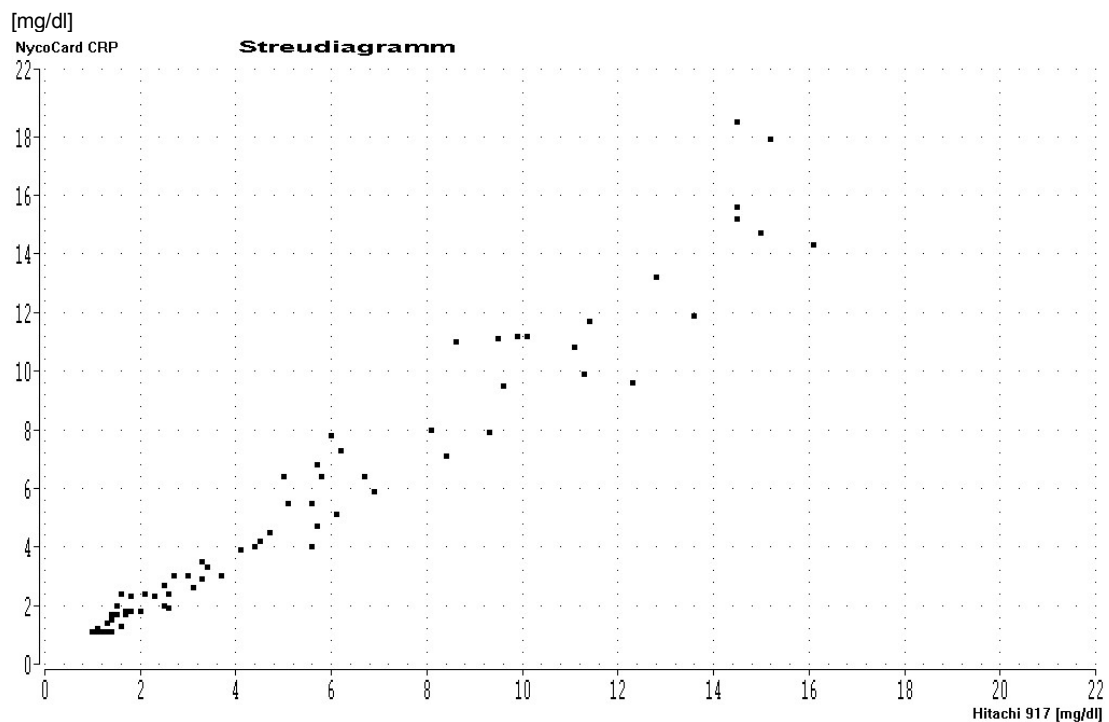


Abb. 4.4: Messwertverteilung NycoCard[®] CRP

Für den Referenznachweis Tina-quant® CRP ergibt sich ein Mittelwert von $\bar{x} = 5,96$ mg/dl, eine Standardabweichung von $\sigma = 4,6707$ mg/dl, ein Standardfehler des Mittelwertes von $SEM = 0,5664$ mg/dl und ein Variationskoeffizient von $CV = 0,7831$. Beim Testgerät NycoCard® CRP liegt der errechnete Mittelwert bei $\bar{x} = 6,04$ mg/dl, die Standardabweichung bei $\sigma = 4,9007$ mg/dl, der Standardfehler des Mittelwertes bei $SEM = 0,5943$ mg/dl und der Variationskoeffizient bei $CV = 0,8116$.

Im K-S-Test weisen $P(\text{Hitachi 917}) = 0,0007$ und $P(\text{NycoCard}^{\circledR} \text{ CRP}) = 0,0001$ auf eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung hin.

Mit $P(\text{Hitachi 917}) = 0,0001$ und $P(\text{NycoCard}^{\circledR} \text{ CRP}) = 0,0000$ im Chi-Quadrat-Test wird die Nullhypothese einer Normalverteilung verworfen.

Die Spearman-Rang-Korrelation ergibt für das Nachweispaar Tina-quant® CRP und NycoCard® CRP einen Korrelationskoeffizienten $R = 0,9838$. Die zweiseitige Signifikanz beträgt $P = 0,0000$.

Der Wilcoxon-Test für nicht normalverteilte, verbundene Stichproben weist mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,8053$ auf ein zufälliges Zustandekommen der Paardifferenzen hin.

Methodenvergleiche

Bei der Bestimmung der Passing-Bablok-Regression liegen sowohl $b = 1$, als auch $c = 0$ im Konfidenzintervall. Dadurch wird die Nullhypothese der Äquivalenz beider Methoden aufrechterhalten.

Der Bland-Altman's-Methodenvergleich sagt aus, dass mit einer Wahrscheinlichkeit $P = 0,5642$ die Differenzen beider Methoden zufällig zustande kommen.

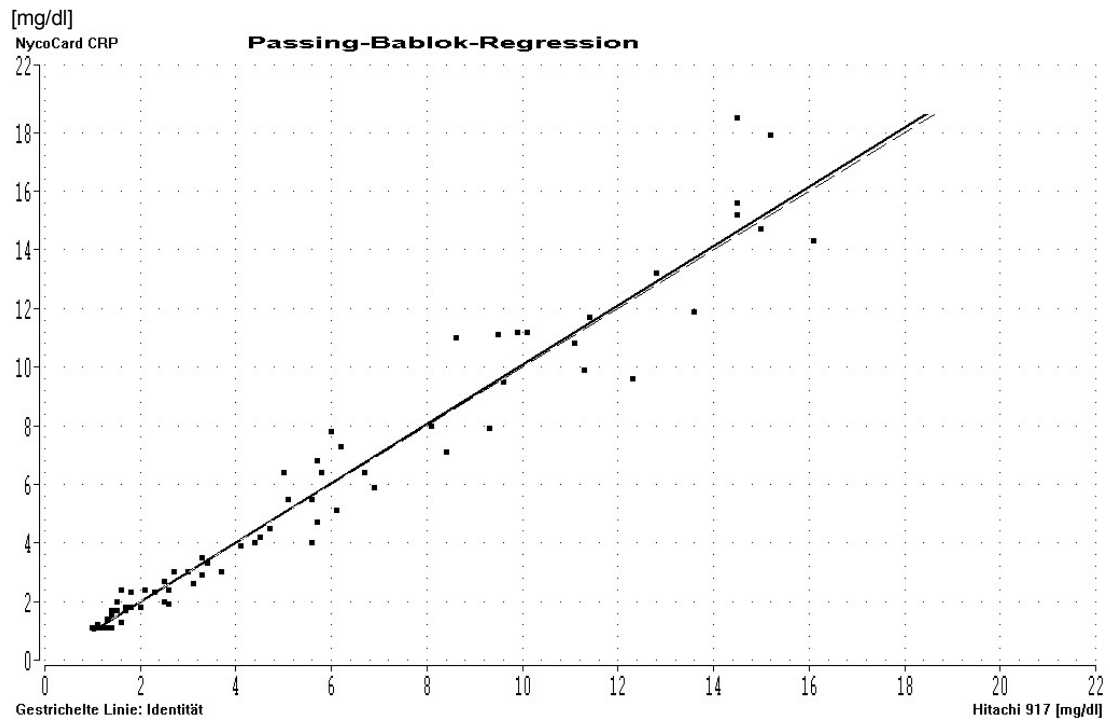


Abb. 4.5: Passing-Bablok-Regression NycoCard® CRP – Hitachi 917

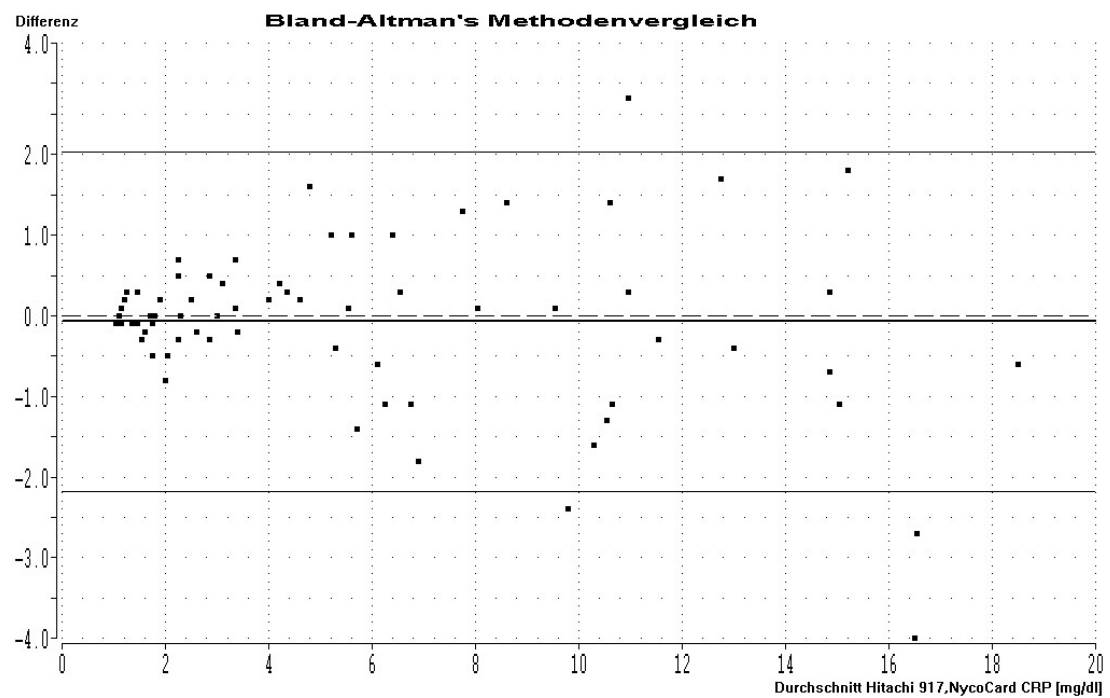


Abb. 4.6: Bland-Altman's-Methodenvergleich NycoCard® CRP – Hitachi 917

Präzisionsmessung

Für den NycoCard®CRP Nachweis ergibt sich bei der Präzisionsmessung ein Mittelwert von $\bar{x} = 2,31 \text{ mg/dl}$ und eine Standardabweichung von $\sigma = 0,1370 \text{ mg/dl}$. Der Variationskoeffizient beträgt $CV = 0,0593$.

Der Kolmogoroff-Smirnoff-Test spricht mit $P = 0,1502$ und der χ^2 -Anpassungstest mit $P = 0,3720$ für eine Normalverteilung der Präzisionsmesswerte.

4.2.2 Micros® CRP

In Abbildung 4.7 ist die Messwertverteilung des Testgerätes Micros® CRP im Vergleich zu den ermittelten Referenzwerten des Hitachi 917 dargestellt.

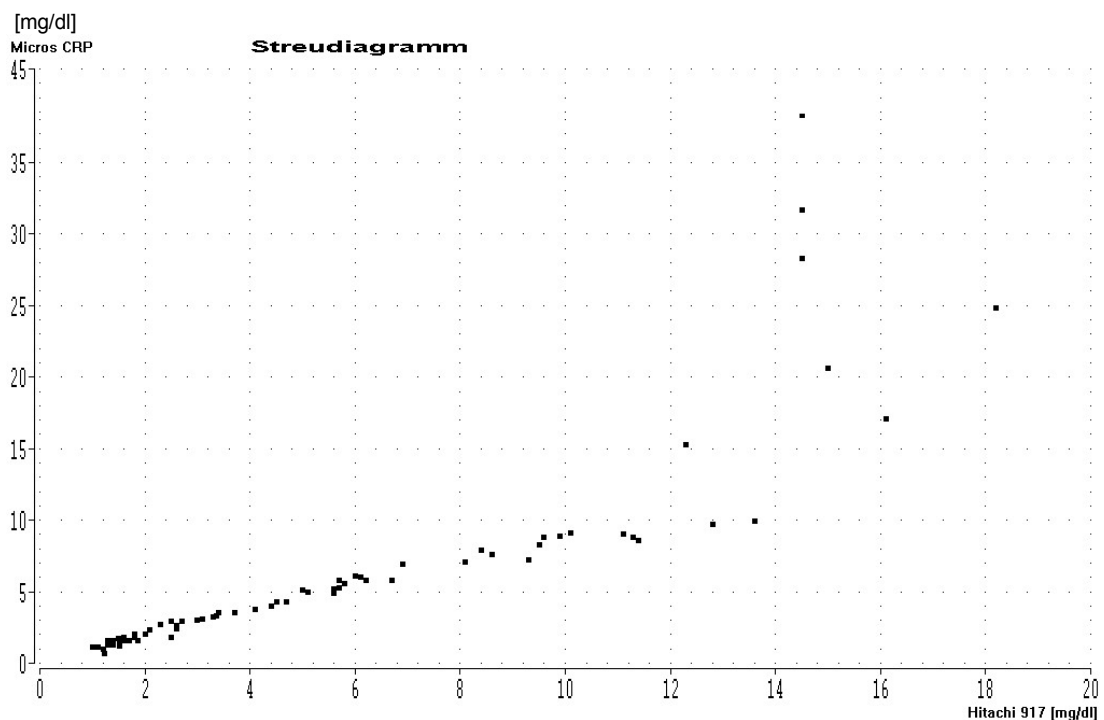


Abb. 4.7: Messwertverteilung Micros® CRP

Wie unter 4.2.1 schon beschrieben ergibt sich für den Tina-quant® CRP ein Mittelwert von $\bar{x} = 5,96 \text{ mg/dl}$, eine Standardabweichung $\sigma = 4,6707 \text{ mg/dl}$, ein Standardfehler des Mittelwertes von $SEM = 0,5664 \text{ mg/dl}$ und ein Variationskoeffizient von $CV = 0,7831$. Für das Micros® CRP beträgt der Mittelwert

$\bar{x} = 7,05$ mg/dl, die Standardabweichung $\sigma = 8,5598$ mg/dl, der Standardfehler SEM = 1,0386 mg/dl und der Variationskoeffizient CV = 1,2147.

Die Wahrscheinlichkeiten von $P(\text{Hitachi 917}) = 0,0007$ und $P(\text{Micros}^{\text{®}} \text{ CRP}) = 0,0000$ im Kolmogoroff-Smirnoff-Test deuten auf eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung hin.

Im Chi-Quadrat-Test wird mit $P(\text{Hitachi 917}) = 0,0001$ und $P(\text{Micros}^{\text{®}} \text{ CRP}) = 0,0000$ die Nullhypothese einer Normalverteilung verworfen.

Die Spearman-Rang-Korrelation ergibt einen Korrelationskoeffizienten $R = 0,9934$ mit einer zweiseitigen Signifikanz $P = 0,0000$.

Der Wilcoxon-Test für nicht normalverteilte, verbundene Stichproben weist mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,2576$ auf ein zufälliges Zustandekommen der Paardifferenzen hin.

Methodenvergleiche

Beim Methodenvergleich durch die Passing-Bablok-Regression befinden sich $b = 1$ und $c = 0$ im Konfidenzintervall. Somit bleibt die Nullhypothese der Äquivalenz der beiden Methoden bestehen.

Mit $P = 0,0995$ besagt der Methodenvergleich nach Bland und Altman, dass die Differenzen der beiden Methoden zufällig zustande kommen und die Methoden als äquivalent bezeichnet werden können.

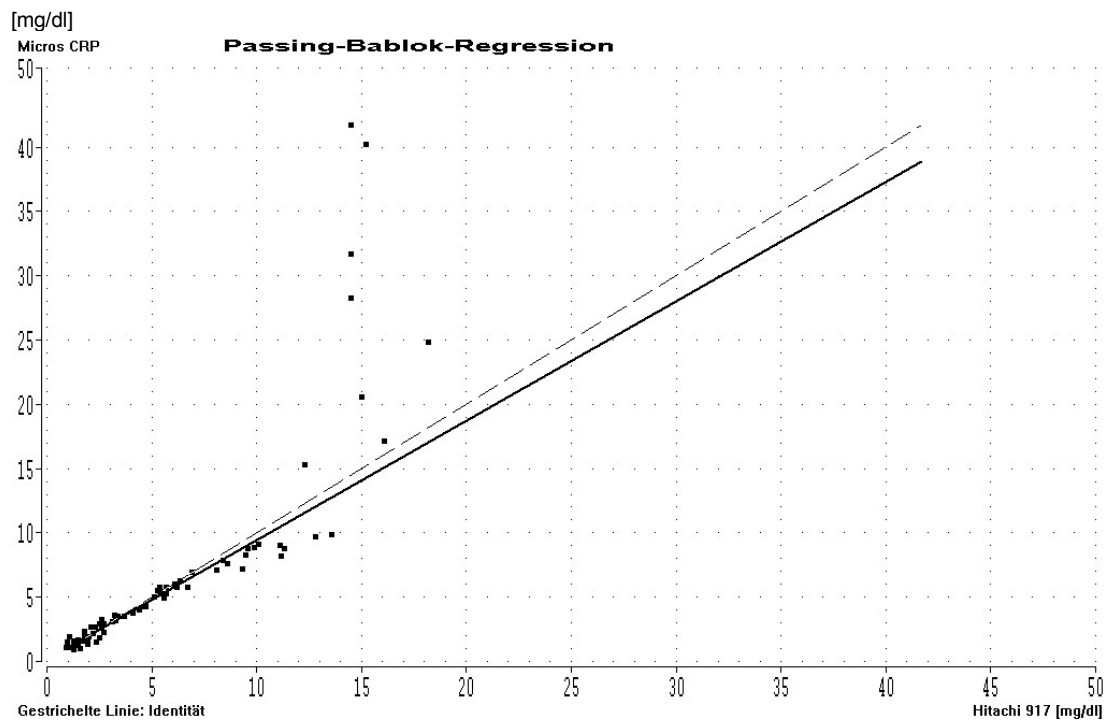


Abb. 4.8: Passing-Bablok-Regression Micros[®] CRP – Hitachi 917

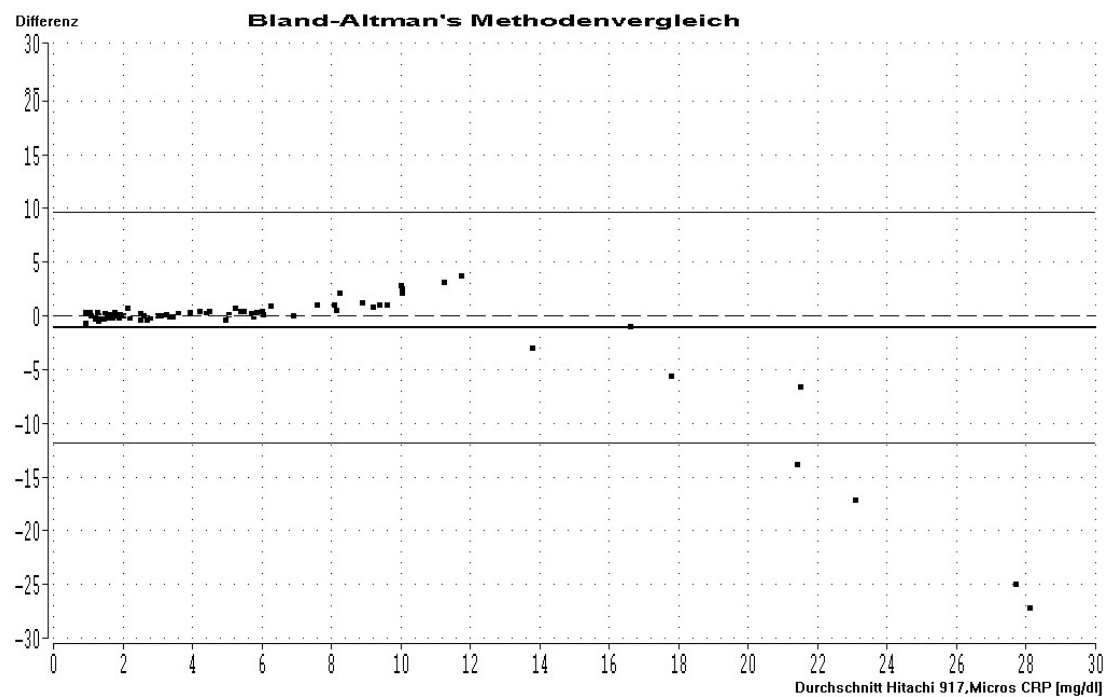


Abb. 4.9: Bland-Altman's-Methodenvergleich Micros[®] CRP – Hitachi 917

Präzisionsmessung

Der Mittelwert der 10 Messungen zur Präzisionsbestimmung des Micros[®] CRP beträgt $\bar{x} = 2,33$ mg/dl, die Standardabweichung $\sigma = 0,0675$ mg/dl und der Variationskoeffizient $CV = 0,0290$.

Mit $P = 0,0351$ im Kolmogoroff-Smirnoff-Test und $P = 0,0006$ im χ^2 -Test sprechen die Tests auf Normalverteilung für eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung.

4.3 D-Dimer Messergebnisse

4.3.1 NycoCard[®] D-Dimer

Die Messwerte des Testgerätes NycoCard[®] D-Dimer und des Zentrallaborgerätes miniVIDAS[®], das die Referenzwerte liefert, sind in Abbildung 4.10 als Streudiagramm dargestellt.

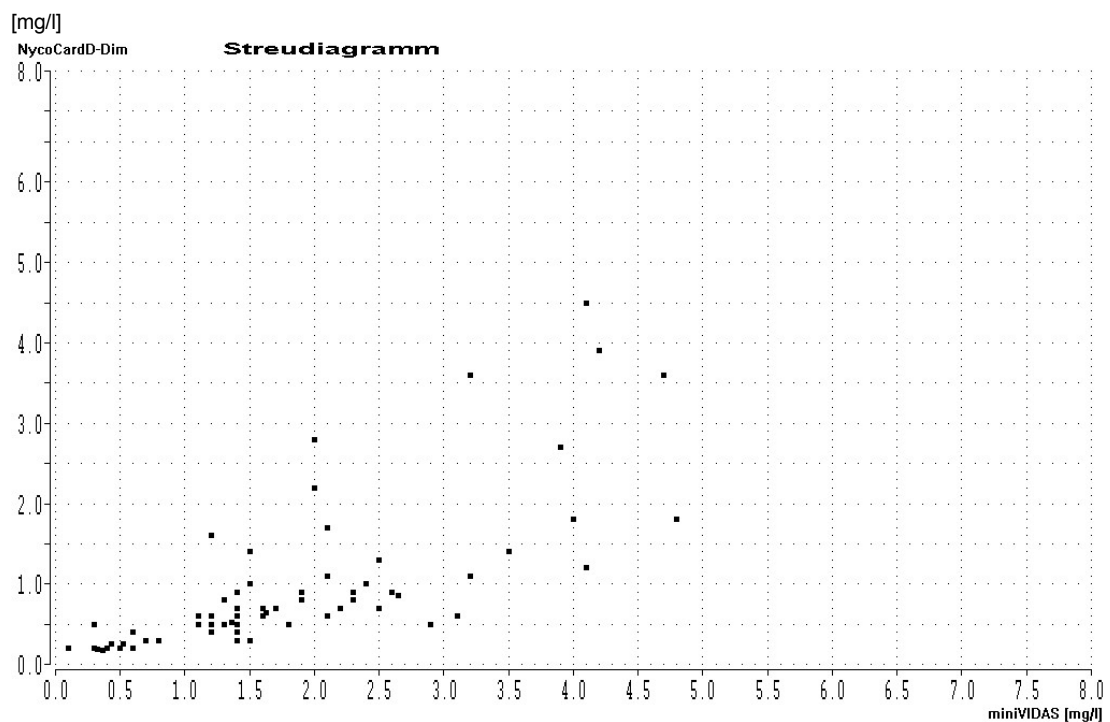


Abb. 4.10: Messwerte NycoCard[®] D-Dimer

Für das Referenzgerät miniVIDAS® ergibt sich ein Mittelwert $\bar{x} = 2,02$ mg/l, eine Standardabweichung $\sigma = 1,4474$ mg/l, ein Standardfehler des Mittelwertes von SEM = 0,1795 und ein Variationskoeffizient CV = 0,7176. Beim Testgerät NycoCard® D-Dimer beträgt der Mittelwert $\bar{x} = 1,18$, die Standardabweichung $\sigma = 1,3943$, der Standardfehler SEM = 0,1729 und der Variationskoeffizient CV = 1,1862.

Im Kolmogoroff-Smirnoff-Test weisen $P(\text{miniVIDAS}) = 0,0034$ und $P(\text{NycoCard}^{\circledR} \text{ D-Dimer}) = 0,0000$ auf eine signifikante Abweichung der Stichprobe von einer Normalverteilung hin.

Im Chi-Quadrat-Test sprechen $P(\text{miniVIDAS}) = 0,0000$ und $P(\text{NycoCard}^{\circledR} \text{ D-Dimer}) = 0,0000$ für eine Ablehnung der Nullhypothese Normalverteilung.

Der Korrelationskoeffizient mittels Spearman-Rang-Korrelation errechnet beträgt $R = 0,8270$ und hat eine zweiseitige Signifikanz mit $P = 0,0000$.

Der Wilcoxon-Test für verbundene, nicht normalverteilte Stichproben gibt eine Wahrscheinlichkeit von $P = 0,0000$ für eine Zufälligkeit der Paardifferenzen an.

Methodenvergleiche

Bei der Passing-Bablok-Regression liegt $c = 0$ innerhalb des Konfidenzintervalls, $b = 1$ jedoch außerhalb. Somit wird die Nullhypothese der Äquivalenz beider Methoden abgelehnt.

Beim Bland-Altman's-Methodenvergleich ergibt eine Wahrscheinlichkeit von $P = 0,0000$ für die Zufälligkeit der Differenzen der beiden Methoden.

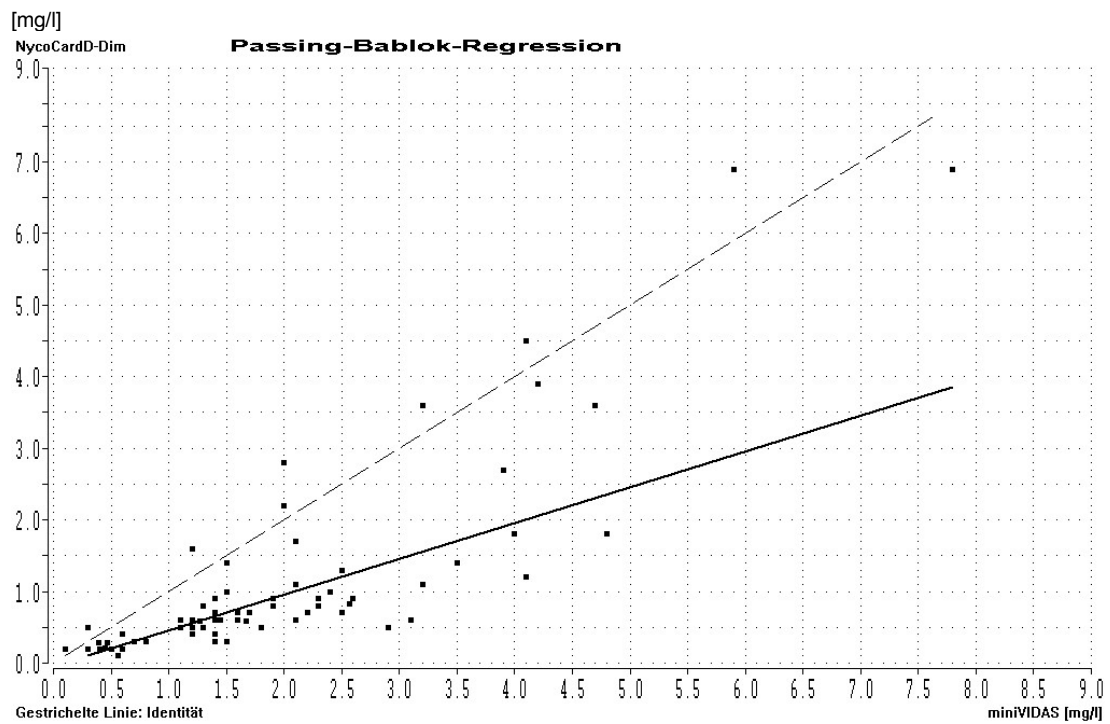


Abb. 4.11: Passing-Bablok-Regression NycoCard® D-Dimer – miniVIDAS

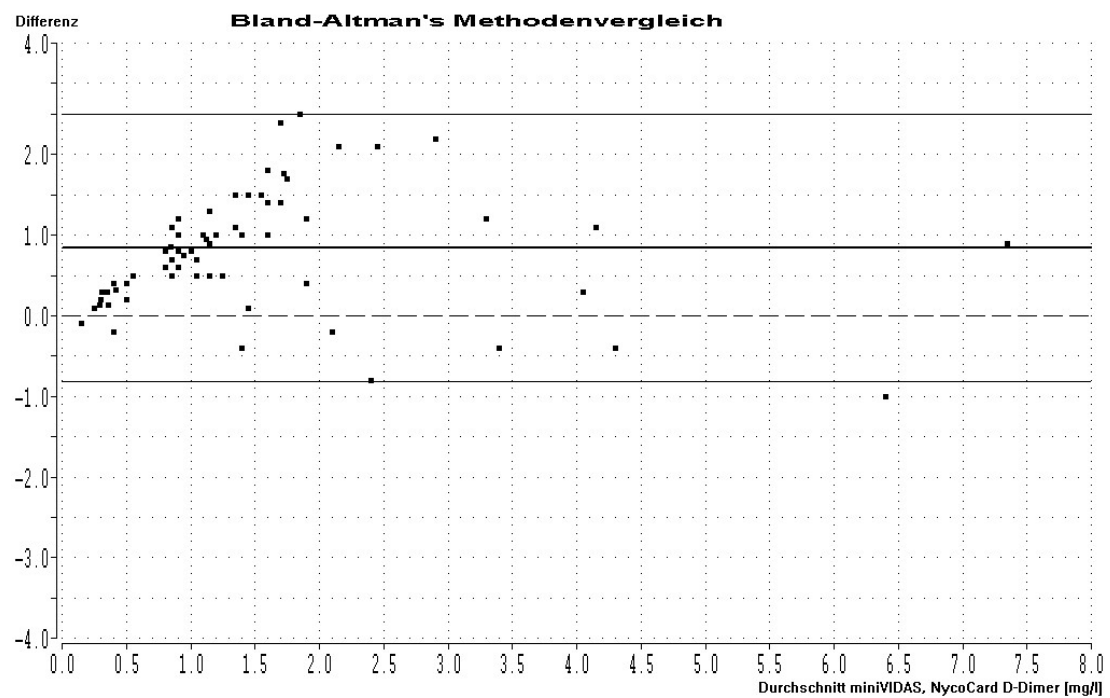


Abb. 4.12: Bland-Altman's-Methodenvergleich NycoCard® D-Dimer – miniVIDAS

Beurteilung diagnostischer Tests

Die Untersuchung der Messergebnisse mittels Vierfeldertafel ergibt für NycoCard® D-Dimer eine Sensitivität von 94,83%, eine Spezifität von 85,71%, eine positive Likelihood Ratio von 6,6379 und eine negative Likelihood Ratio von 0,0603.

Präzisionsmessung

Die Präzisionsmessung des NycoCard® D-Dimer Assays ergibt einen Mittelwert von $\bar{x} = 0,3000$ mg/l. Da alle Messungen das gleiche Ergebnis lieferten, sind Standardabweichung und Variationskoeffizient gleich Null. Die Untersuchung auf Normalverteilung entfällt.

4.3.2 Turbiquant® D-Dimer

Die mit dem D-Dimer Turbitimer® ermittelten Turbiquant® D-Dimer Messwerte sind in Abhängigkeit der Messwerte des miniVIDAS® als Wertepaare in einem Streudiagramm in Abbildung 4.13 dargestellt.

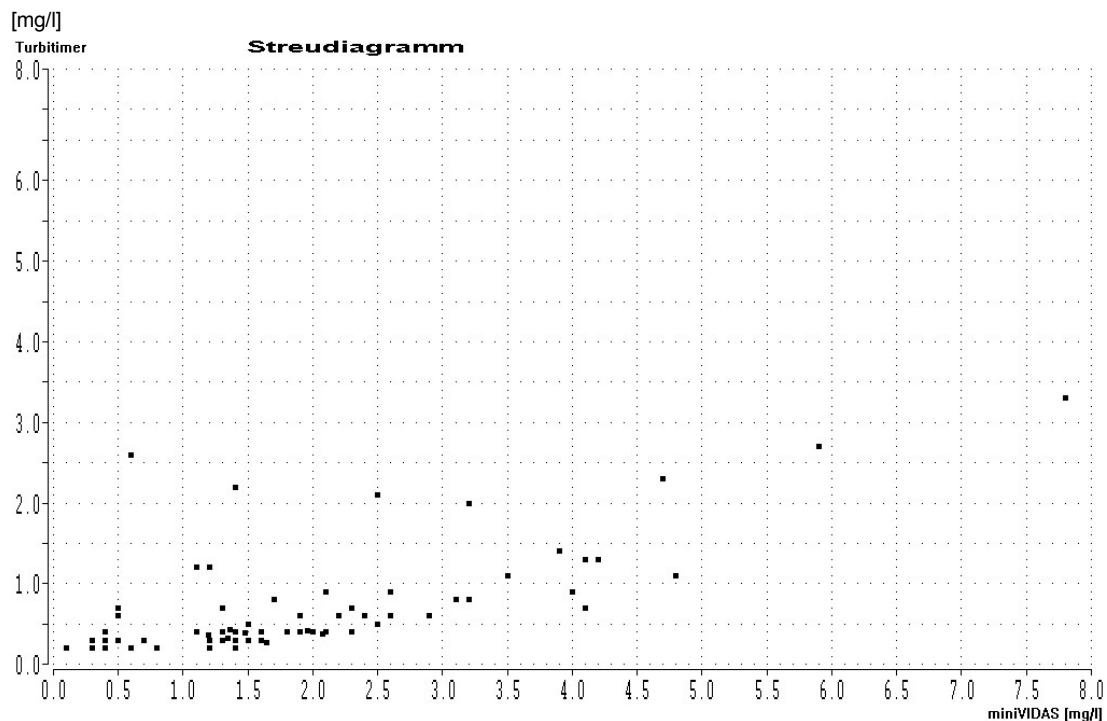


Abb. 4.13: Messwerte Turbitimer®/Turbiquant® D-Dimer

Wie in 4.3.1 schon beschrieben beträgt der Mittelwert des miniVIDAS® $\bar{x} = 2,02$ mg/l, die Standardabweichung $\sigma = 1,4474$ mg/l, der Standardfehler des Mittelwertes $SEM = 0,1795$ und der Variationskoeffizient $CV = 0,7176$. Beim Testgerät D-Dimer Turbitimer® errechnet sich ein Mittelwert von $\bar{x} = 0,75$ mg/l, eine Standardabweichung $\sigma = 0,6835$ mg/l, ein Standardfehler von $SEM = 0,0848$ und ein Variationskoeffizient von $CV = 0,9086$.

Der Kolmogoroff-Smirnoff-Test beschreibt mit $P(\text{miniVIDAS}) = 0,0034$ und $P(\text{Turbitimer}^{\circledR}) = 0,0000$ eine signifikante Abweichung der Stichprobe von einer Normalverteilung.

Der Chi-Quadrat-Test lehnt mit $P(\text{miniVIDAS}) = 0,0000$ und $P(\text{Turbitimer}^{\circledR}) = 0,0000$ die Nullhypothese einer Normalverteilung ab.

Die Spearman-Rang-Korrelation errechnet für den miniVIDAS® und D-Dimer Turbitimer® einen Korrelationskoeffizienten von $R = 0,6495$ mit einer zweiseitigen Signifikanz $P = 0,0000$.

Der Wilcoxon-Test für verbundene, nicht normalverteilte Stichproben gibt mit einer Wahrscheinlichkeit $P = 0,0000$ an, dass die Paardifferenzen der Stichproben zufällig sind.

Methodenvergleiche

Bei der Passing-Bablok-Regression liegt $c = 0$ innerhalb des Konfidenzintervalls, $b = 1$ liegt jedoch außerhalb, so dass die Nullhypothese der Äquivalenz beider Methoden abgelehnt wird.

Der Bland-Altman-Methodenvergleich ergibt mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,0000$ ein zufälliges Auftreten der Differenzen zwischen beiden Methoden.

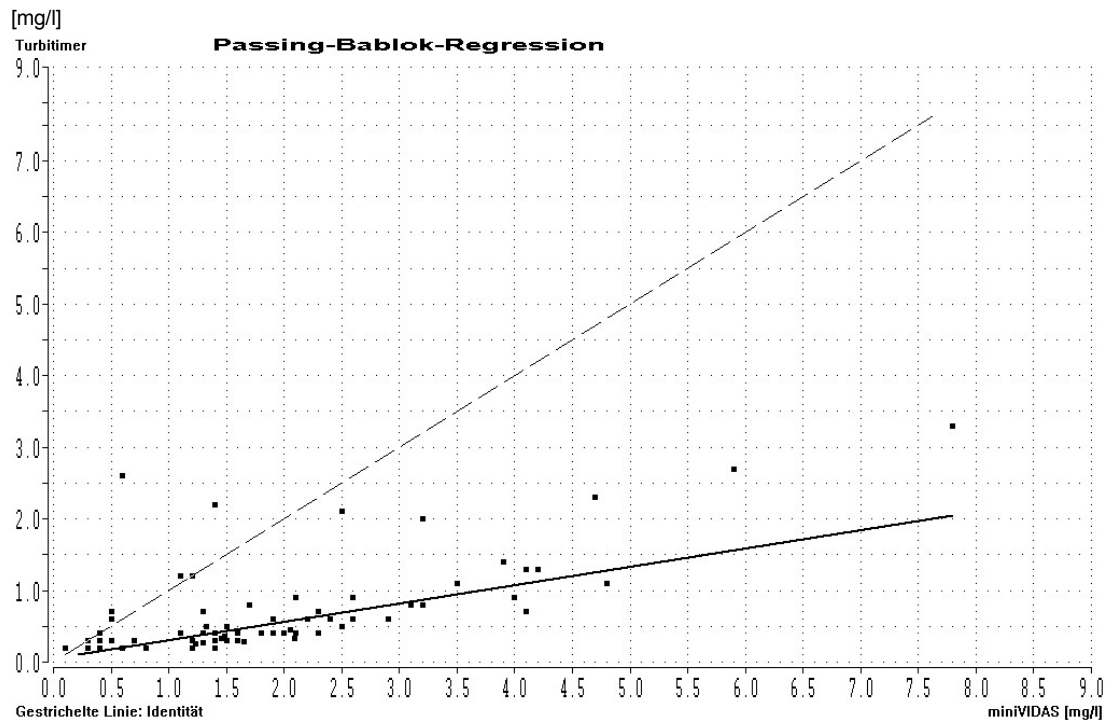


Abb. 4.14: Passing-Bablok-Regression Turbitimer®/Turbiquant® D-Dimer – miniVIDAS

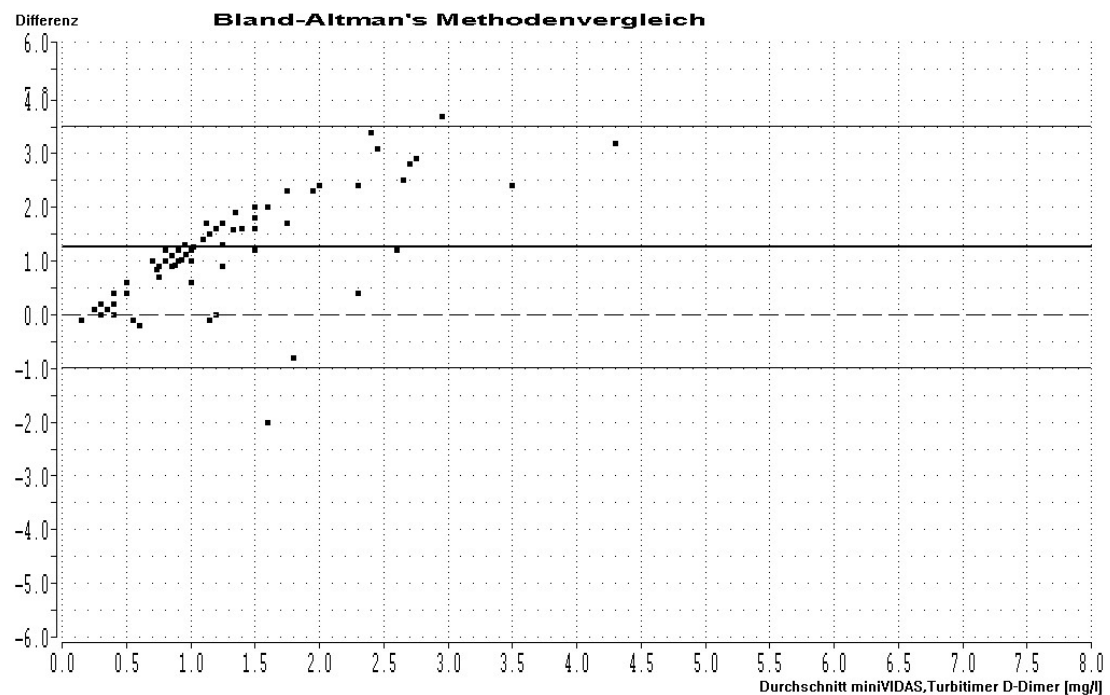


Abb. 4.15: Bland-Altman's-Methodenvergleich Turbitimer®/Turbiquant® D-Dimer - miniVIDAS

Beurteilung diagnostischer Tests

Bei der Untersuchung der Messergebnisse hinsichtlich ihrer diagnostischen Aussagekraft ergibt sich für den Nachweis Turbiquant[®] D-Dimer eine Sensitivität von 93,10%, eine Spezifität von 42,86%, eine positive Likelihood Ratio von 1,6293 und eine negative Likelihood Ratio von 0,1609.

Präzisionsmessung

Bei der Berechnung der Präzision des Turbiquant[®] D-Dimer ergibt sich ein Mittelwert von $\bar{x} = 0,3707$, eine Standardabweichung von $\sigma = 0,0179$ und ein Variationskoeffizient von $CV = 0,0482$. Der Kolmogoroff-Smirnoff-Test ergibt mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,0798$ und der Chi²-Test mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,1086$ eine Normalverteilung.

5 Diskussion

5.1 Point-of-Care Diagnostik

Mit dem im Rahmen eines Diabetes Managements 1941 durch Miles entwickelten Glucoseteststreifen für Urin (Produktname: Clinitest) hat das Point of Care Testing seinen eigentlichen Anfang gefunden. Seit dieser Zeit hat es eine Vielzahl von Entwicklungen im Bereich der Point-of-Care Diagnostikverfahren und –geräte gegeben. Verfahrensoptimierungen und der Einsatz der modernen Mikroelektronik haben dazu beigetragen die Erfassung der Messergebnisse und ihre Auswertung zu automatisieren. Die praktische Handhabung einiger Testgeräte wurde im Verlauf der Jahre so verbessert und für den Anwender optimiert, dass sie sogar vom Patienten selbst z.B. zur Bestimmung der Blutglucose angewendet werden kann. Viele Apotheker nutzen die Point-of-Care Systeme bereits indem sie die Bestimmung von Blutglucose, Cholesterin, PTT, Quick etc. kommerziell anbieten.

Der Einsatz von Point-of-Care Diagnostikgeräten wurde bereits in vielen Studien untersucht und beschrieben. So konnten Murray et al. zeigen, dass durch den Einsatz von Point-of-Care Testing in Notaufnahmen eine signifikante Zeiteinsparung erreicht werden konnte. Die durchschnittliche Aufenthaltsdauer von Patienten in der Notaufnahme reduzierte sich dabei von 4h 22min auf 3h 28min [76]. Nach Einrichtung eines POCT-Labors in der Notaufnahme des Massachusetts General Hospitals mit der Möglichkeit zur Durchführung ausgewählter Tests und Untersuchungen von Glucose, HCG, CK-MB, Troponin und der Anwendung von Urinteststreifen zeigte sich eine Reduktion der Aufenthaltsdauer der Patienten in der Notaufnahme um durchschnittlich 41,3 Minuten [64]. De Serio et al. untersuchten den Einsatz von Point-of-Care Nachweisen für Troponin I, Myoglobin und CK-MB in einer Notaufnahme hinsichtlich ihrer Korrelation mit der vorhandenen Labormethode, sowie der Analysendauer. Dabei ergaben sich für alle Nachweise gute Korrelationen und eine Reduktion der Analysendauer um durchschnittlich 54 min [27]. Auch Collinson zeigte, dass bei der Untersuchung von kardialen Markern durch POCT die Analysendauer von 72 min auf 20 min signifikant verringert werden konnte [17]. Eine Untersuchung von Fitch et al. zur Gerinnungskontrolle während

kardiovaskulären Operationen zeigte, dass die Point-of-Care Methode gut mit der Labormethode korreliert und anstelle von 74 bis 78 Minuten nur 2 Minuten und 14 Sekunden für die Analyse in Anspruch nimmt [36].

Als ein wichtiges Qualitätsmerkmal in der medizinischen Versorgung werden von den Patienten die für sie meistens als unangenehm, zeitraubend und oft sehr belastend empfundenen Wartezeiten z.B. auf Testergebnisse angesehen. Dabei ist es unwesentlich welche Ursache der Wartezeit zugrunde liegt. Galloway und Woods haben daher in einer Studie untersucht, welche Wartezeiten von Patienten einer hämatologischen Klinik akzeptiert werden. Nach Meinung der Patienten dürfte die Wartezeit 30min auf keinen Fall überschreiten, vielmehr sollte diese im Laufe der Zeit auf maximal 20min reduziert werden können. Selbst durch die Einführung eines Air-Tube-Transportsystems zum schnelleren Probentransport ins Labor konnte den Anforderungen der Patienten nicht entsprochen werden. Erst nach der Einführung eines Point-of-Care Testsystems konnten die gesetzten Zeitziele erreicht werden [37].

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der medizinischen Diagnostik ist oft die Analysendauer einer Probe. In den zitierten Studien wird gezeigt wie es durch den Einsatz der Point-of-Care Diagnostik zu einer signifikanten Reduzierung der Analysendauer und damit einer deutlichen Zeiteinsparung in der Diagnostik kommt.

Neben dem Vorteil der Zeiteinsparung sind weitere Vorteile beschrieben worden. So haben Dahler - Eriksen et al. die Einführung eines CRP Point-of-Care Testing Systems in die ambulante Patientenversorgung Dänemarks untersucht. Sie stellten fest, dass durch diese Einführung die Anzahl der Proben Transporte von den Arztpraxen zu den zentralen Labors um 40% abnahmen. Weiterhin konnten sie nachweisen, dass durch die Einführung von CRP Point-of-Care Testing Systemen deutliche Kostenersparnisse zu erzielen sind [22]. Harvey zeigte das POCT allgemein keine höheren Kosten verursacht [48].

Für einige Parameter ist die Qualität von POCT bereits nachgewiesen worden. Als Beispiel wäre die Blutglucosediagnostik zu nennen. Hier wurden verschiedene Geräte bereits in Studien untersucht und es konnte gezeigt werden, dass diese in hohem Maße mit Standardmethoden korrelieren [19].

Viele Vorteile des Einsatzes von POCT Systemen sind durch zahlreiche Studien belegt worden. Oft gibt es keine Aussagen über die analytischen Anforderungen im Vergleich mit der Standardlaboranalytik. Es muss deshalb nun untersucht werden, in wie weit die in dieser Arbeit getesteten Geräte den analytischen Anforderungen entsprechen.

5.2 HbA_{1c} Messgeräte

Nachfolgend sollen vergleichend die analytische Fähigkeit der Messgeräte, ihre Fehlerquellen, sowie ihre möglichen Anwendungsgebiete untersucht werden.

Im Vergleich mit dem Variant II zeigt der NycoCard[®]HbA_{1c} Nachweis eine sehr gute Korrelation von $R = 0,9252$ und ebenfalls eine sehr gute Präzision mit einem Variationskoeffizienten von $CV = 0,76\%$ auf. Dieser Wert liegt mit $CV < 5\%$ im angegebenen Bereich des Herstellers und damit weit unter dem in den Richtlinien zur Qualitätssicherung der Bundesärztekammer geforderten Grenzwert von 6% [14]. Der Wilcoxon-Test besagt nach Einbringen des Korrekturfaktors mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,6062$, dass die sich ergebenden Paardifferenzen zufällig auftreten und somit die Nullhypothese einer symmetrischen Verteilung aufrechterhalten wird [56,108]. Es muss deshalb bei den aufgetretenen Paardifferenzen von zufälligen Fehlern ausgegangen werden.

Der Methodenvergleich nach Passing und Bablok zeigt, dass die Nullhypothese der Äquivalenz der Methoden Variant II und NycoCard[®]HbA_{1c} verworfen werden muss. Hingegen bezeichnet der Bland-Altman's Methodenvergleich die beiden Methoden als äquivalent. Aus diesen Ergebnissen lässt sich keine eindeutige Aussage hinsichtlich der Äquivalenz zusammenfassen.

In der Beurteilung des Assays NycoCard[®]HbA_{1c} in seiner Funktion als diagnostischer Test ergibt sich eine Sensitivität des Nachweises von $92,31\%$ und eine Spezifität von $78,57\%$. Die positive Likelihood-Ratio ist mit $4,3077$ als gut und die negative Likelihood-Ratio mit $0,0979$ als sehr gut zu beurteilen.

Der NycoCard[®]HbA_{1c} Assay hat in der vergleichenden Untersuchung mit dem Variant II gute Messergebnisse aufzuweisen, was durch eine sehr gute Korrelation

und zufällige Streuung in der statistischen Auswertung gezeigt wurde. Als diagnostischer Test ist er geeignet eindeutige Aussagen bezüglich einer guten und einer nicht ausreichenden Diabetestherapie machen.

Bei einer vergleichenden Studie des NycoCard[®]HbA_{1c} mit dem Mono S (HPLC) wurde für das Point-of-Care System von NycoCard ein Variationskoeffizient CV = 1,7% und eine Korrelation von $R = 0,994$ gefunden [78]. In einer weiteren Studie ist wie auch in dieser Untersuchung der NycoCard[®]HbA_{1c} Assay mit dem Tinaquant Nachweis verglichen worden. Dort ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $R = 0,94$ mit einer Verschiebung um 0,92 auf der Y-Achse. Der Variationskoeffizient wurde von den Verfassern in einem Bereich von 8,5-15,3% angegeben [45]. Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der gleichen Assays zeigt hinsichtlich der Korrelation ein vergleichbares Ergebnis. Der Variationskoeffizient ist mit CV = 2,4% jedoch deutlich besser ausgefallen.

Der Borataffinitätstest Glycosal zeigte im Vergleich zum Variant II eine Korrelation von $R = 0,98$, wohingegen der IMx Nachweis, welcher ebenfalls auf Borataffinität basiert, im Vergleich zu einer HPLC Methode einen Korrelationskoeffizienten von $R = 0,857$ aufweist [91,99]. Glycogel B, ein anderer Borataffinitätstest, der als Matrix ein Gel verwendet, wurde der Agargelelektrophorese gegenübergestellt. Hierbei korrelierte Glycogel B mit $R = 0,95$ [40].

Neben Borataffinitätsnachweisen für HbA_{1c} sind immunturbidimetrische Point-of-Care Assays auf dem Markt. Untersuchungen haben hier gezeigt, dass der DRx HbA_{1c} Nachweis eine Korrelation von $R = 0,935$ bezogen auf die DiaSTAT HPLC von Bio-Rad aufweist [93]. Ein immunturbidimetrischer Nachweis von Boehringer Mannheim, durchgeführt mit dem Hitachi 911, korreliert mit $R = 0,96$ mit der Standard HPLC Methode [42]. Unimate von Roche hat eine Korrelation von $R = 0,98$ mit der Diamant HPLC von Bio-Rad [71].

Bei der Untersuchung einer HbA_{1c} Nachweismethode mit Hilfe kapillärer isoelektrischer Focussierung im Vergleich zum Variant von Bio-Rad betrug der Korrelationsfaktor beider Methoden $R = 0,872$ [105].

Der NycoCard[®]HbA_{1c} Assay zeigt somit auch im Vergleich zu anderen Studien und anderen Point-of-Care Nachweismethoden sehr gute Ergebnisse. Wichtig ist es

jedoch nicht nur die Korrelation der Ergebnisse zu betrachten, die bei dem hier getesteten Assay als sehr gut bezeichnet werden kann, sondern es ist auch die Aussagefähigkeit der Methode zu berücksichtigen. Diese ist beim NycoCard®HbA_{1c} ebenfalls als sehr gut zu beurteilen.

Fehler und ihre Quellen

Es gibt keine absolut genaue Messung von kontinuierlichen Größen. Die Fehlergrenzen werden bestimmt durch systematische Fehler wie z.B. Gerätefehler, Eichfehler oder Unspezifität der Methode. Diese Fehler sind oft schwer zu entdecken aber prinzipiell vermeidbar. Zufällige Fehler ergeben sich aus dem Zusammenwirken zahlreicher Fehlerursachen wie z.B. Ablesefehler, Beobachtungsfehler. Diese Fehler sind vom gegebenen System, wozu auch der Beobachter mit seinem Ablesegeschick gehört, nicht vermeidbar. Ihr Einfluss kann aber durch Wiederholung der Messungen stark reduziert werden.

Fehler in der Bedienung des NycoCard®HbA_{1c} Assays können durch falsches Pipettieren von Proben und Reagenzien sowie durch zu geringe Vermischung der einzelnen Reaktionskomponenten und fehlerhafter Reagenzien in Erscheinung treten. Durch sorgfältiges Arbeiten, regelmäßigen Weißabgleich und Kontrolle der Wirksamkeit der Reagenzien durch die mitgelieferte Kontrolllösung wurde versucht den Einfluss dieser systematischen Fehlerursachen zu minimieren.

Unterschiedliche Messergebnisse könnten auch dadurch begründet sein, dass der NycoCard®HbA_{1c} das gesamte Glykohämoglobin misst und die Werte für die HbA_{1c} Fraktion mittels eines im NycoCard® Reader II gespeicherten Algorithmus errechnet. Im Gegensatz dazu wird beim Variant II durch die HPLC die HbA_{1c} Fraktion getrennt von den anderen Glykohämoglobinfractionen erfasst. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einem bekannten Diabetes mellitus im Gegensatz zu gesunden Personen der Prozentsatz des gesamten Glykohämoglobins im Borataffinitätsnachweis stärker ansteigt als der Prozentsatz der HbA_{1c} Fraktion der HPLC [77]. Daraus könnte sich auch der höhere Grenzwert des Normbereichs des NycoCard®HbA_{1c} ergeben.

Für das Prinzip der HbA_{1c} Messung mittels Borataffinitätsverfahren konnte ein Einfluss von hohen Konzentrationen an Glucose, Bilirubin oder Triglyceriden in

verschieden konzentrierten Glycohämoglobinproben ausgeschlossen werden [10]. Die als Aldiminform bezeichnete Schiff'sche Base führt in beiden Assayformen zu keiner Erhöhung der Messwerte, da sie bei der HPLC entfernt wird und so auf den Affinitätsnachweis keine Wechselwirkung ausübt [69].

Der Einfluss von Hämoglobinvarianten, sowie Hämoglobinveränderungen auf das Ergebnis von HbA_{1c} Messungen wurde vielfach untersucht. Für die Kationenaustauschflüssigkeitschromatographie ist eine Beeinflussung der Messwerte im Sinne einer erhöhten Angabe von HbA_{1c} für carbamyliertes und acetyliertes Hämoglobin beschrieben worden [110,12]. Falsch niedrige Werte können bei dieser Methode für Hämoglobinvarianten wie HbAA , HbAS , HbAC , HbCC , persistierendes HbF etc. durch das Entstehen zusätzlicher Peaks der glykierten Varianten auftreten [110,67,74]. Das Problem der falschen HbA_{1c} Bewertung durch Hämoglobinvarianten kann durch relative Angabe des HbA_{1c} zum Gesamthämoglobin A ($\text{HbA}_0 + \text{HbA}_{1c}$) oder des gesamten HbX_{1c} aller Varianten zum Gesamthämoglobin X ($\text{HbX}_0 + \text{HbX}_{1c}$) vermieden werden [110,67].

Der Borataffinitätstest zeigt für alle Hämoglobinvarianten, mit Ausnahme der homozygoten Form von HbS und HbC , Ergebnisse in einem akzeptablen Bereich [110,85]. Der Nachweis von HbA_{1c} über einen Borsäureaffinitätsassay hat gegenüber der HPLC den Nachteil der Erfassung des Gesamtglykohämoglobins und der anschließenden Berechnung der HbA_{1c} Fraktion aus dem Gesamtglykohämoglobin, dafür ist er aber gegenüber Störeinflüssen von Hämoglobinvarianten weniger empfindlich.

Anwendungsgebiete

Mit diesem Point-of-Care Nachweis lässt sich der HbA_{1c} Anteil im Blut ermitteln. Mit Hilfe der gemessenen Werte können dann Rückschlüsse auf die Einstellung eines Diabetes mellitus gezogen werden. Der Point-of-Care Nachweis für HbA_{1c} eignet sich daher sehr gut für den Einsatz in der ärztlichen Praxis.

Unter den verschiedenen medizinischen Fachgebieten gibt es einige, für welche die Bestimmung des HbA_{1c} im täglichen Betrieb von besonderem Interesse ist.

Der Schwerpunkt der HbA_{1c} Kontrolle liegt mit Sicherheit auf den Gebieten der Inneren Medizin und Kinderheilkunde, da vor allem hier Diagnose, Einstellung und

Kontrolle des Diabetes mellitus durchgeführt werden. Für die Prävention von Spätschäden dieser Erkrankung ist die langfristige Kontrolle der Diabetestherapie von entscheidender Bedeutung. Cahill et al. konnten zeigen, dass eine Prävalenz von 44% für eine Diabetische Retinopathie (DR) bei Patienten mit einer Krankheitsdauer eines Typ I Diabetes größer als 10 Jahre besteht. Weiterhin zeigten die Patienten mit einer DR signifikant erhöhte HbA_{1c} Werte, wohingegen die Prävalenz der DR keinen Zusammenhang mit dem Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht, Mikroalbuminurie oder Bluthochdruck aufwies [15]. Ein HbA_{1c} Wert < 8% scheint ein guter Bereich zu sein, um einer Nephropathie mit Entwicklung einer Mikroalbuminurie vorzubeugen [73]. Dieses zeigt, dass die Bestimmung des HbA_{1c} gerade im ambulanten Bereich mit Hilfe der Point-of-Care Diagnostik eine bedeutende Maßnahme ist, um die Entwicklung von Komplikationen zu kontrollieren und diesen vorbeugen zu können.

Ein wesentlicher Vorteil der Point-of-Care Nachweismethoden im Vergleich zu den Bestimmungsmethoden im Labor ist der schnelle Ergebniserhalt vor Ort. Thaler et al. fanden heraus, dass durch den Einsatz eines schnellen HbA_{1c} Assays mit sofortiger Verfügbarkeit der Ergebnisse im Gegensatz zur herkömmlichen HbA_{1c} Bestimmung die Therapie von Diabetikern vermehrt intensiviert wurde und bei Nachkontrollen einen günstigen Einfluss auf zuvor erhöhte Werte aufwies [97].

Mit diesem Effekt können die Kosten in der Behandlung des Diabetes mellitus II verringert werden, da die durch den Diabetes verursachten Komplikationen und Begleiterkrankungen hier die wesentlichen Kostenfaktoren darstellen [65].

Die Gynäkologie und Geburtshilfe ist ein weiteres Gebiet, auf dem die HbA_{1c} Bestimmung von großer Bedeutung ist. Gerade in der Schwangerschaft, wie auch schon zum Zeitpunkt der Konzeption, sollte ein Diabetes mellitus optimal eingestellt sein, um einen möglichst risikoarmen und komplikationslosen Schwangerschaftsverlauf gewährleisten zu können.

Während bei Nichtdiabetikerinnen die Rate der Missbildungen ihrer Kinder bei 0,9% liegt, ist diese bei Müttern mit einem insulinpflichtigen Diabetes mit 5,3% signifikant erhöht. So wird bei einem HbA_{1c} ≥ 8,5% während der Frühschwangerschaft von 22% Missbildungen berichtet, wohingegen bei einem HbA_{1c} < 8,5% mit nur 3,3% zu rechnen ist [8]. Dieses macht umso deutlicher welche Bedeutung der Kontrolle des Glucosestoffwechsels der Mutter zukommt. Neben der Bestimmung der aktuellen

Blutglucosekonzentration, erfolgt in der Schwangerenvorsorge eine Messung der Glykohämoglobine, um einen Eindruck der Stoffwechsellage der vergangenen Wochen zu bekommen. Die Erfassung des HbA_{1c} sollte in einem vierwöchigen Rhythmus geschehen, um eine Erhöhung des HbA_{1c} in den pathologischen Bereich frühzeitig zu erkennen.

Hier bietet sich der Einsatz des NycoCard®HbA_{1c} in gynäkologischen Praxen wie auch auf gynäkologischen Stationen an. Die Vorteile des Nachweises liegen in der schnellen Ergebniserzeugung, die Zweitkonsultationen unnötig macht, und in der Einsparung von Transportwegen, -zeiten und -kosten. Weiterhin werden Verzögerungen in der Behandlung vermieden. Diese Vorteile gelten vor allem für die ambulante Kontrolle von Diabetikerinnen in der Schwangerschaft.

Da der NycoCard®HbA_{1c} Nachweis gerade im frühpathologischen Bereich eine hohe Korrelation mit dem Variant II aufzeigt, hat sein Einsatz in gynäkologischen Einrichtungen seinen Stellenwert.

Für den stationären Bereich der Versorgung und Kontrolle von Schwangeren ist zu überlegen, ob es bei großen Probenzahlen und geringerem logistischen Aufwand in großen Kliniken sinnvoller ist die Proben die normale Laborroutine durchlaufen zu lassen.

Einsatzorte

Als Einsatzorte des hier getesteten Nachweises eignen sich Arztpraxen sowie Stationen mit ambulanter Patientenversorgung. Weiterhin alle Stationen und Einrichtungen, die größere logistische Anstrengungen aufbringen oder in Anspruch nehmen müssen, um die zu untersuchenden Proben in ein Labor zu transportieren. Die Möglichkeit Transportwege und -zeiten einzusparen vermindert gleichzeitig Transportrisiken, wie zum Beispiel unsachgemäße Lagerung. Daraus ergeben sich zusätzlich finanzielle Einsparmöglichkeiten. Hier liegt ein großer Vorteil des NycoCard®HbA_{1c}. Neben den Einsparungsmöglichkeiten in den Bereichen von Transport und Finanzen steht die Ergebniserzeugung in kürzester Zeit im Vordergrund. Zwar ist das HbA_{1c} kein Parameter, das im akuten Notfall bestimmt wird, aber bei Nutzung eines auswärtigen Labors wird meistens ein neuer Termin zur Ergebniseröffnung benötigt. Im Gegensatz dazu ist es beim NycoCard®HbA_{1c}

möglich gleich beim ersten Arztbesuch des Patienten die Ergebnisse zu erlangen und notwendige therapeutische Maßnahmen zu ergreifen.

Diese Methode eignet sich daher besonders für den Bereich der ambulanten Patientenversorgung.

Probenaufkommen

Ein weiteres Kriterium für den Einsatz des NycoCard[®]HbA_{1c} ist die Menge der zu untersuchenden Proben. Bei großen Kliniken mit einer Vielzahl von Proben, die im täglichen Betrieb bearbeitet werden, ist fraglich, ob der Einsatz des NycoCard[®]HbA_{1c} aus personeller und zeitlicher Sicht sinnvoll ist. Da die Analysen hier manuell durchgeführt werden, wird für die Dauer der POC Analyse Personal in Anspruch genommen. Der Zeitbedarf beträgt je Probe zwar lediglich 2-3 min, jedoch summiert sich dieser bei einer großen Probenanzahl. Bei kleinerem Probenaufkommen ist jedoch der Einsatz des NycoCard[®]HbA_{1c} dem eines großen Laborgerätes vorzuziehen. Der apparative Aufwand ist wesentlich geringer, der Nachweis einfach zu handhaben und es müssen vor Beginn der Messungen oder auch einer einzelnen Messung keine aufwendigen Kalibrierungsarbeiten durchgeführt werden.

5.3 CRP Messgeräte

Ergebnisauswertung

Der getestete Nachweis NycoCard[®]CRP zur Bestimmung der Konzentration des C-reaktiven Proteins im Vollblut zeigt verglichen mit dem Tina-quant[®]CRP/Hitachi 917 eine sehr gute Korrelation von $R = 0,9838$.

Die Präzision des Nachweises liegt mit einem Variationskoeffizienten von $CV = 1,88\%$ deutlich unter dem geforderten Grenzwert von 5% [14].

Die Auswertung des Wilcoxon-Tests ergibt mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,8053$ eine symmetrische Verteilung der Paardifferenzen und damit eine zufällige Streuung der Differenzen der Messwertpaare [56,108]. Aus diesem Grund kann von zufälligen Fehlern bei abweichenden Messergebnissen ausgegangen werden.

Die Methodenvergleiche nach Passing-Bablok und Bland-Altman sprechen beide für eine Äquivalenz der Methoden NycoCard®CRP und Hitachi 917/Tina-quant®CRP.

Das zweite Testgerät Micros®CRP weist im Vergleich zum Referenznachweis Tina-quant®CRP /Hitachi 917 eine sehr gute Korrelation von $R = 0,9934$ auf. Auch bei diesem Nachweis liegt die Präzision mit einem Variationskoeffizienten von $CV = 0,92\%$ deutlich unter dem in den Richtlinien der Bundesärztekammer geforderten Grenzwert von 5% [14].

Für den Micros®CRP errechnet der Wilcoxon-Test mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,2576$ ein zufälliges Zustandekommen der Paardifferenzen, d.h. diese sind symmetrisch verteilt und treten zufällig auf [56,108]. So sind auftretende Messwertabweichungen nicht auf systematische Fehler zurückzuführen, wie sie durch fehlerhafte Kalibrierung oder durch Unspezifität der Methode verursacht sein können.

Die Untersuchung mittels der Methodenvergleichstests nach Passing-Bablok und Bland-Altman ergibt für beide Tests eine Äquivalenz der Nachweismethoden des Micros®CRP und des Hitachi 917/Tina-quant®CRP.

Bewertung im Vergleich zu anderen Studien

In dieser Arbeit konnten für das Micros®CRP die Ergebnisse von Roberts et al., bestätigt werden, welche bei diesem Gerät eine Impräzision $<8\%$, sowie eine hohe Konkordanz mit dem Dade Behring N II High Sensitivity CRP festgestellt haben [98]. Auch der NycoCard®CRP Assay zeigte in den Untersuchungen von Urdal et al., bei denen 234 Patientenproben im Vergleich mit einer turbidimetrischen Serummethode analysiert wurden, eine sehr gute Korrelation mit $R = 0,96$ [101]. Eine norwegische Gruppe [21] analysierte den NycoCard®CRP Nachweis für Serum- und Plasmaproben und fand eine Korrelation von $R = 0,85$, wohingegen Dahler-Eriksen et al. für die auch in dieser Studie verwendete Vollblutvariante des Assays eine Korrelation von $R = 0,94$ ermittelt haben. Der Vorteil des Vollblutnachweises und der Grund der besseren Korrelation wurden in der geringeren Anzahl an Analysenschritten vermutet. Ein wichtiger Faktor ist jedoch die interpersonelle Variation der Messergebnisse, denn die gleichen Proben wurden mit Hilfe des

gleichen Assays von Laborpersonal durchgeführt, woraufhin der Korrelationskoeffizient $R = 0,95$ betrug [21]. Eine weitere Studie fand beim Vergleich einer CRP Point-of-Care Methode mit der Standardlabormethode einen Korrelationskoeffizienten von $R > 0,96$. Auch hier zeigte der Bland-Altman's-Test keine signifikante Abweichung von der Standardlabormethode [88]. Der vom Hersteller angegebene Variationskoeffizient der Präzision von $CV = 5-8\%$ im Laborbetrieb und bis zu $CV = 15\%$ in der ärztlichen Praxis wird mit $CV = 1,88\%$ weit unterschritten. Bei einer Studie zum Einsatz des NycoCard® CRP in der ärztlichen Praxis konnte bei Bedienung des Assays durch Nichtlaborpersonal ebenfalls ein sehr niedriger Variationskoeffizient von $CV = 0,7\%$ festgestellt werden [21].

Beide Methoden zeigen ähnliche Ergebnisse wie ein vergleichbarer Point-of-Care Fluoreszenzimmunoassay, welcher im Vergleich mit dem Dade Behring N High Sensitivity Assay eine Korrelation von $R = 0,969$ aufzeigt [96].

Fehlerquellen

Die zufällig auftretenden Paardifferenzen können sowohl durch unkontrollierte Schwankungen innerhalb der Geräte, als auch durch die Bedienung des Gerätes selbst auftreten [83]. Während der Studie wurde der zu beeinflussende Anteil des zufälligen Fehlers durch sorgfältiges Arbeiten minimiert. Mögliche systematische Fehler, welche nach den oben beschriebenen Ergebnissen nicht offensichtlich sind, können durch Unspezifität der Nachweismethode oder Bedienungsfehler verursacht werden. Für den NycoCard®CRP Assay konnten Urdal et al. zeigen, dass Hyperlipidämien zu einer Erhöhung der CRP Messwerte führen können, wohingegen ein Einfluss von Bilirubin, Amyloid P oder Rheumafaktoren ausgeschlossen werden konnte [101]. Falsch positive CRP Messungen wurden von Benoist et al. bei zwei Patienten nach Nierentransplantationen beschrieben. Sie hatten Antilymphozytenglobulin von Kaninchen zur Immunsuppression erhalten und in Folge dessen Antikörper (human anti-rabbit antibody = HARA) gegen dieses gebildet. Jegliche Testmethoden, welche zur CRP Bestimmung anti-CRP Antikörper verwenden, die vom Kaninchen stammen, wurden so falsch positiv beeinflusst [9]. Der Tina-quant®CRP Referenzassay beinhaltet Antikörper von Ziegen, so dass in

diesem Fall keine Beeinflussung zustande gekommen wäre. Bei den beiden Point-of-Care Nachweisen ist die Herkunft der Antikörper jedoch nicht angegeben, so dass eine Interaktion nicht hätte ausgeschlossen werden können. Im Zweifelsfall ist bei Patienten mit immunologischer Suppression des Immunsystems oder Einsatz anderer Immunglobuline in Abwägung der Herkunft der verschiedenen Seren eine andere Methode vorzuziehen.

Diagnostische Breite des CRP und Anwendungsgebiete

Aufgrund der Vorteile, die das CRP gegenüber anderen Entzündungsparametern in der Diagnostik aufweist, hat es sich bereits in der klinischen und praktischen Anwendung als hilfreich und therapieweisend gezeigt. So konnte es sich als diagnostisches Kriterium für Infektionen auf vielen Gebieten durchsetzen. Zum Beispiel vermag das CRP gegenüber der Leukozytenzahl besser zur Diagnose einer protrahierten Entzündung nach Appendektomie beizutragen [41].

Auch in der Pädiatrie zeigt die Bestimmung des CRP eine deutlich bessere Aussagekraft als andere Entzündungsparameter wie die Leukozytenzahl oder die Körpertemperatur, wenn es sich um die Diagnostik einer Neugeborenensepsis oder postoperativen Sepsis handelt [23,16]. Weiterhin kann die CRP Konzentration als Anhaltspunkt für die Dauer einer antibiotischen Therapie bei bakteriellen Neugeboreneninfektionen herangezogen werden [32].

Gerade für das Fachgebiet der Pädiatrie eignet sich die Point-of-Care CRP Diagnostik in besonderem Maße, da nur geringe Probenvolumina von 25µl beim NycoCard®CRP und mindestens 30µl beim Micros®CRP benötigt werden. So muss nicht für jede Analyse eine Venenpunktion durchgeführt werden, da eine Kapillarblutentnahme ausreichend ist.

Im Bereich der Notfall- und Intensivmedizin ist die Bestimmung des CRP ebenfalls von großem Nutzen. Neben der schnellen Diagnostik entzündlicher Erkrankungen und daraufhin raschen Therapieeinleitung, bietet das CRP einen Parameter zur Beurteilung des Outcome und der Mortalität von Patienten vor Operationen nach akuter Ischämie von Extremitäten oder von Patienten mit ischämischem Insult [62,26]. Auf diesen Gebieten ist der Vorteil der Point-of-Care CRP Analyse in der kurzen Zeitspanne der Ergebnisgewinnung zu suchen. Eine Studie zum Einsatz von

Point-of-Care Geräten auf der Notfallstation des Universitätskrankenhauses von Aintree ergab eine signifikante Zeitersparnis. Die durchschnittliche Zeit bis zum Ergebniserhalt bei Transport der Proben ins Zentrallabor mittels Personal betrug 58min, über ein pneumatisches Röhrensystem 49min und durch Analyse mittels POC 5min [103].

Ein weiteres Gebiet, für das die CRP Bestimmung mit Hilfe von Point-of-Care Diagnostikgeräten wesentliche Vorteile bietet, ist die allgemeinmedizinische oder internistische Praxis. Hier steht die Diagnostik entzündlicher Geschehnisse im Vordergrund. Die Vorzüge, welche die Diagnostikgeräte in diesem Bereich bieten, sind Einsparungen in der Diagnosezeit und damit auch in der Zeitspanne bis zur Therapieeinleitung. Es kann ein optimierter Einsatz von Antibiotika durchgeführt werden, sowie Kosten bei CRP Bestimmung und zweizeitiger Befunderöffnung eingespart werden [22].

Auf Grund der sehr guten Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigt sich, dass beide Point-of-Care Geräte zur CRP Bestimmung den diagnostischen Anforderungen eines Laborgerätes für den Klinikbetrieb gewachsen sind. Die Grundeigenschaften dieser Geräte sind vom Hitachi 917 jedoch verschieden, so dass für den praktischen Einsatz die alltägliche Leistungsfähigkeit betrachtet werden muss.

Größter Nachteil des Nycocard®CRP ist vermutlich die manuelle Probenvorbereitung und Testdurchführung. Das bedeutet einen vermehrten Arbeits- und Zeitaufwand. Daher muss für diesen Nachweis relativ mehr Arbeit aufgewendet werden, als für den Tina-quant®CRP/Hitachi 917 Nachweis, bei welchem die Probenbearbeitung automatisiert ist und dadurch wesentlich schneller erfolgt. Neben der CRP Bestimmung kann bei Bedarf über den Hitachi 917 nahezu jeder übliche klinisch-chemische Parameter aus der gleichen Probe bestimmt werden.

Als automatisiertes Testverfahren mit manueller Probenbestückung stellt der Micros®CRP einen weniger arbeitsaufwendigen Nachweis dar. Der Zeitaufwand ist jedoch mit dem des Nycocard®CRP vergleichbar, da eine selektive CRP Messung nicht erfolgen kann, sondern gleichzeitig immer ein maschinelles Differentialblutbild erstellt wird. Mit beiden Point-of-Care Nachweisen lassen sich jedoch bis zu zwanzig Bestimmungen pro Stunde durchführen.

Als Schlussfolgerung bleibt festzustellen, dass beide Point-of-Care Assays zur Messung der Konzentration an C-reaktivem Protein im Blut, der NycoCard®CRP und Micros®CRP, aufgrund ihrer sehr guten Ergebnisse im Vergleich mit der turbidimetrischen Zentrallabormethode Tina-quant®CRP/Hitachi 917 für den praktischen Einsatz sehr zu empfehlen sind. Ein Einsatz ist somit vor allem in der Pädiatrie, der Notfall- und Intensivmedizin, sowie in der ärztlichen Praxis denkbar.

5.4 D-Dimer Messgeräte

Ergebnisauswertung

Der NycoCard® D-Dimer Assay hat im Vergleich mit dem Referenznachweis miniVIDAS eine gute Korrelation von $R = 0,8270$. Im Bereich des cut-off-Wertes zeigt er eine sehr gute Präzision. Bei allen Messungen zur Erfassung der Präzision wurde der gleiche Messwert ermittelt. Damit liegt der Variationskoeffizient bei $CV = 0,0\%$. Ein Grenzwert des Variationskoeffizienten für Nachweise zur Bestimmung von D-Dimeren wurde bisher nicht festgelegt [14]. In der Produktbeschreibung befinden sich ebenfalls keine Angaben über einen einzuhaltenden Bereich.

Der Wilcoxon-Test zeigt mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,0000$, dass auftretende Paardifferenzen nicht symmetrisch verteilt sind. Das heißt, es muss von einem systematischen Fehler ausgegangen werden [56,108].

Die Methodenvergleiche nach Passing-Bablok und Bland-Altman sagen beide aus, dass die Testmethoden miniVIDAS und NycoCard®D-Dimer nicht äquivalent sind.

Bei der Untersuchung des NycoCard®D-Dimer hinsichtlich seiner Aussagekraft ergeben sich eine gute positive Likelihood-Ratio von 6,6379 und eine sehr gute negative Likelihood-Ratio von 0,0603. Sensitivität und Spezifität sind mit 94,83% und 85,71% ebenfalls als sehr gut zu bezeichnen. So wird der NycoCard®D-Dimer den Anforderungen hinsichtlich seiner diagnostischen Aussagekraft im Vergleich zum miniVIDAS Assay gerecht.

Der zweite untersuchte Point-of-Care Nachweis zur Bestimmung von D-Dimeren war das Turbiquant[®]D-Dimer/TurbitimerSystem. Es zeigt im Vergleich zur Referenzmethode eine sehr geringe Korrelation von $R = 0,6495$. Die Präzision des Nachweises liegt im cut-off-Bereich mit einem Variationskoeffizienten von $CV = 1,52\%$ in einem guten Bereich. Wie schon oben erwähnt wurde ein allgemeiner Grenzwert bisher nicht festgelegt [14]. Der ermittelte Wert liegt sogar knapp unter dem vom Hersteller angegebenen Bereich von $1,6 - 4,7\%$.

Mit einer Wahrscheinlichkeit von $P = 0,0000$ weist der Wilcoxon-Test auf eine zufällige Verteilung der Messwertabweichungen hin. Deshalb muss auch bei diesem Nachweis von einem systematischen Fehler ausgegangen werden [56,108].

Beim Vergleich der Methoden mittels Passing-Bablok-Regression und Bland-Altman-Test ergibt sich kein Hinweis auf eine Äquivalenz der Methoden.

Bezüglich seiner Eigenschaft als diagnostischer Test weist der Turbiquant[®]D-Dimer Nachweis eine gute Sensitivität von $93,10\%$ und eine mäßige Spezifität von $42,86\%$ auf. Daraus folgt eine gute negative Likelihood-Ratio von $0,1609$. Die positive Likelihood-Ratio ist jedoch mit $1,6293$ als mangelhaft zu bewerten.

Vergleich mit anderen Studien

In dieser Arbeit wurde für den NycoCard[®] D-Dimer eine Korrelation von $R = 0,8270$ mit dem Referenztest miniVIDAS ermittelt. Dieses Ergebnis ist mit dem von Gogstad et al. vergleichbar. Sie fanden eine Korrelation von $R = 0,81$ des NycoCard[®] D-Dimer mit einem im Handel erhältlichen ELISA. Der Variationskoeffizient der Präzisionsmessung bewegte sich bei Gogstad et al. zwischen $CV = 8-12\%$ [38]. In verschiedenen Studien wurde der NycoCard[®]D-Dimer Assay hinsichtlich seines negativen Vorhersagewertes für das Vorhandensein von Lungenembolien und tiefen Venenthrombosen untersucht. Es ergaben sich Werte zwischen 90% und 100% [58,11,92,107,68,102].

Die in der Produktbeschreibung des Turbiquant[®]D-Dimer-Reagenz mittels Passing-Bablok beschriebene Korrelation von $R = 0,806$ im Vergleich mit einem im Handel erhältlichen ELISA konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden [20]. Als negativer Vorhersagewert für tiefe Venenthrombosen wurden für diesen Assay Werte zwischen 73% und 95% ermittelt [102].

In einer Studie von Dempfle et al. wurden 23 quantitative D-Dimer Nachweise, welche auf verschiedenen Nachweismethoden (ELISA, LPIA, IFA) und Automatisierungsgraden beruhten, im Hinblick auf die Entwicklung eines standardisierten Kalibrators untersucht [25]. Dabei wurden gepoolte Plasmaproben von sowohl gesunden Individuen, als auch von Patienten mit tiefen Venenthrombosen, disseminierter intravasaler Gerinnung, Myokardinfarkt und fibrinolytischer Therapie verwendet. Die Ergebnisse der einzelnen Nachweise wurden auf die gemittelten und konvertierten Probenwerte bezogen. Für den VIDAS D-Dimer ergab sich eine Korrelation von $R = 0,843$, für den Turbiquant® D-Dimer $R = 0,963$ und den NycoCard® D-Dimer $R = 0,975$.

Es wurden bereits andere Point-of-Care D-Dimer Assays mit dem VIDAS als Referenzgerät untersucht. Dabei ergaben sich für den STA Liatest D-Dimer eine Korrelation von $R = 0,82$ und den MDA D-Dimer eine Korrelation mit $R = 0,75$ [50]. Beide Methoden basieren auf der Agglutination von antikörperbeschichteten Latexpartikeln. Im Vergleich zum Tina-quant® D-Dimer zeigten der CARDIAC D-Dimer wie auch der STA Liatest D-Dimer eine Korrelation von $R = 0,91$ [24]. Der VIDAS D-Dimer Nachweis korrelierte wiederum mit $R = 0,91$ mit einem herkömmlichen ELISA [79].

Fehlerquellen

Bei allen vergleichenden Studien können neben zufällig auftretenden Fehlern und Messwertabweichungen, die nicht beeinflussbar sind, systematische Fehler vorkommen. Der Wilcoxon-Test hat hier für beide Assays gezeigt, dass vom Vorhandensein systematischer Fehler ausgegangen werden muss. Die Methodenvergleiche weisen eine Nichtäquivalenz auf. An dieser Stelle ist zu bemerken, dass es bis heute keine Standardisierung für D-Dimer Nachweismethoden gibt. So ist nicht festgelegt über welches Epitop der heterogenen Gruppe der D-Dimere die Bestimmung geführt werden soll.

Eine Komponente, die derartige Abweichungen verursachen kann, sind die Bedienungsfehler. Von den beiden untersuchten Assays ist der NycoCard® D-Dimer wesentlich anfälliger gegenüber Bedienungsfehlern als der Turbiquant® D-Dimer. Bei diesem Nachweis muss besonderes Augenmerk auf die Durchführung und

Einhaltung der Reaktionszeiten gerichtet werden. Schon geringe Abweichungen von diesen Zeiten führen zu fehlerhaften Ergebnissen. Ein Einfluss dieser Fehlerkomponente kann nicht ausgeschlossen werden. Bei der Testdurchführung wurde streng auf die Einhaltung der Richtlinien geachtet.

Eine Veränderung, ein Zerfall oder Abbau der in der Probe enthaltenen D-Dimere durch zu lange Lagerung kann ebenfalls zu falschen Messwerten führen. Alle in dieser Studie untersuchten D-Dimer Proben wurden deshalb innerhalb einer Stunde nach Eintreffen im Labor mit allen Nachweisen untersucht.

Eine weitere Quelle eines systematischen Fehlers liegt in der Spezifität der beiden Nachweise NycoCard®D-Dimer und Turbiquant®D-Dimer. In den Produktbeschreibungen findet sich keine weitere Spezifizierung zu den verwendeten Antikörpern. Es ist jedoch möglich, dass unterschiedliche Antikörper zum Einsatz kommen, welche an verschiedenen Epitopen des D-Dimers binden. Aufgrund dieser Tatsache und eines fehlenden internationalen Standards ist mit Abweichungen von Messergebnissen zu rechnen und ein Vergleich dieser erschwert.

Die Ermittlung von Störfaktoren hat ergeben, dass hohe Lipidwerte der zu untersuchenden Proben erhöhte Messwerte beim NycoCard®D-Dimer ergeben, indem die Lipide die Membran auf der Testkarte verstopfen und überschüssige, markierte Antikörper schlechter absorbiert werden können. Darüber hinaus beeinflusst die Anwesenheit von Rheumafaktoren das Messergebnis im Sinne eines falsch hohen Wertes. Erhöhte Hämoglobin- und Bilirubinkonzentrationen sollen keinen Einfluss auf das Messergebnis des NycoCard®D-Dimer haben [38]. Für den Turbiquant®D-Dimer Nachweis ist ebenfalls bekannt, dass Rheumafaktoren zu erhöhten D-Dimer Ergebnissen führen können [20].

Diagnostische Breite der D-Dimere und Einsatzgebiete

Die Bestimmung von D-Dimeren kommt im klinischen Betrieb vor allem für Patienten in der Notaufnahme und auf Intensivstationen in Betracht. Die Indikation beruht meist auf dem Verdacht des Vorhandenseins einer tiefen Venenthrombose oder Lungenembolie. In einer Studie über den Einsatz eines Point-of-Care D-Dimer Nachweises in einer Notaufnahme in Kanada fand sich ein negativer Vorhersagewert für das Vorhandensein einer tiefen Venenthrombose (TVT) von 96,9% [3].

Weiterhin wurde eine Einteilung der Patienten aufgrund klinischer Kriterien in Wahrscheinlichkeitsgruppen für das Bestehen einer TVT vorgenommen. Es wurde zwischen niedriger, mittlerer und hoher Wahrscheinlichkeit unterschieden. Dadurch ließ sich der negative Vorhersagewert für Fälle mit niedriger Wahrscheinlichkeit auf einen Wert von 100% erhöhen. Das heißt, dass bei negativen (unter dem cut-off liegenden) D-Dimer Konzentrationen das Vorhandensein einer TVT sicher ausgeschlossen werden kann [3]. Dieses Ergebnis der Maximierung des negativen Vorhersagewertes durch Anwendung klinischer Wahrscheinlichkeitsgruppen konnte in weiteren Studien bestätigt werden [57,18,72,29]. Eine andere Studie gibt an, dass beim Ausschluss einer TVT durch das Vorhandensein niedriger klinischer Wahrscheinlichkeit und negativen D-Dimeren sich der Einsatz der Duplex-Sonographie erübrigt, wodurch ein großes Potential zur Kosteneinsparung entsteht [29].

Für die Diagnose von Lungenembolien zeigte sich eine Kombination von Patienteneinteilung in Wahrscheinlichkeitsgruppen und der Bestimmung von D-Dimeren in anderen Studien ebenfalls als gut geeignet. Bei der Mehrheit der Notaufnahmepatienten mit Verdacht auf eine Lungenembolie kann durch Vorliegen einer niedrigen Wahrscheinlichkeit und negativer D-Dimere eine Lungenembolie ausgeschlossen und auf weitere Bildgebung verzichtet werden [109,59].

Neben den beiden Haupterkrankungen Lungenembolie und tiefe Venenthrombose, für die die D-Dimer Bestimmung meistens angewandt wird, gibt es einen weiteren Bereich der Notfallmedizin, in dem sie von großem Nutzen sein kann. Bei der Frage nach einer Bakteriämie oder Sepsis kann das Zutreffen einer solchen Diagnose über negative D-Dimere ausgeschlossen werden. Für grampositive Bakterien besteht ein negativer Vorhersagewert von 96%, für gramnegative von 98% [81]. So kann die D-Dimer Bestimmung nach Angaben der Autoren ein schnelles und sicheres Ergebnis liefern und die Notwendigkeit einer Blutkultur bei negativen Werten ausschließen.

Aus den vorangegangenen Ausführungen ist der große medizinische sowie wirtschaftliche Nutzen der Bestimmung von D-Dimeren gerade in notfall- und intensivmedizinischen Einrichtungen ersichtlich. Darüber hinaus bieten Point-of-

Care Nachweismethoden ein größeres Potential an Zeit- und Kostenersparnis als die Bestimmung von D-Dimeren in zentralen Laboratorien.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien und der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ist der Point-of-Care Nachweis NycoCard®D-Dimer für den klinischen Einsatz zu empfehlen.

Im Gegensatz dazu kann eine Empfehlung des Turbiquant®D-Dimer /Turbitimer aufgrund seiner geringen Korrelation, geringen Spezifität und großen systematischen Messwertabweichungen nicht ausgesprochen werden.

6 Zusammenfassung

Seit der Entwicklung des ersten Uringlucoseteststreifens in den 40er Jahren sind viele verschiedene Point-of-Care Messsysteme auf den Markt gekommen, die mittlerweile große Bereiche der klinischen Diagnostik erfassen. Diese Geräte gewinnen nicht nur bei der Kontrolle und Therapie chronischer Erkrankungen immer mehr an Bedeutung, sondern auch bei Routinemessungen von Standardlaborparametern in der Arztpraxis.

Doch stellt sich hier die entscheidende Frage, ob die Genauigkeit und die Sensibilität der modernen mobilen Testgeräte hinreichend denen der nasschemischen Standardlaborgeräte entsprechen.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung ausgewählter Geräte an Hand verschiedener Messparameter, hinsichtlich ihrer Messgenauigkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse in Bezug zur jeweiligen Standardlabormethode.

Mit den Standardlabormethoden wurden verglichen: auf dem Gebiet der HbA_{1c} Diagnostik das Gerät NycoCard® HbA_{1c} in Verbindung mit dem NycoCard® Reader II der PROGEN BIOTECHNIK GMBH; auf dem Gebiet der CRP Diagnostik der Micros® CRP Nachweis der Firma ABX DIAGNOSTICS und der NycoCard® CRP Nachweis in Verbindung mit dem NycoCard® Reader II der Firma PROGEN BIOTECHNIK GMBH. Für den Bereich der D-Dimer Bestimmung wurden die Nachweise NycoCard® D-Dimer der PROGEN BIOTECHNIK GMBH und Turbiquant® D-Dimer von DADE BEHRING mit der Standardmethode verglichen.

Auf dem Gebiet der HbA_{1c} Diagnostik zeigte der NycoCard® HbA_{1c} Nachweis bezogen auf den Referenznachweis Variant II eine gute Korrelation. Es traten keine systematischen Fehler auf. Hinsichtlich seiner Aussagekraft als diagnostischer Test wies er ein gutes Ergebnis auf. Im Vergleich mit anderen Studien sind die Ergebnisse als sehr gut zu bewerten. Ein Einsatz dieses Nachweises ist vor allem auf den Gebieten der Inneren Medizin, Kinderheilkunde und Frauenheilkunde, sowohl im ambulanten als auch im stationären Bereich zu empfehlen.

Die untersuchten CRP-Nachweise NycoCard® CRP und Micros® CRP wiesen beide im Vergleich zur Referenzmethode Tina-quant® CRP/ Hitachi 917 eine exzellente

Korrelation auf. Es fanden sich bei der Untersuchung keine systematischen Fehler und die Passing-Bablok-Regression wie auch der Bland-Altman's Test zeigten bei beiden Geräten eine Äquivalenz von Test- und Referenznachweis. Diese Ergebnisse sind auch im Vergleich zu anderen Studien als sehr gut zu bewerten. Die hier untersuchten Nachweise NycoCard® CRP und Micros® CRP sind somit sehr für den praktischen Einsatz zu empfehlen, wobei dieser vor allem in der ärztlichen Praxis, der Pädiatrie sowie der Notfall- und Intensivmedizin denkbar wäre.

Auf dem Gebiet der D-Dimer Diagnostik zeigte der NycoCard® D-Dimer Nachweis im Vergleich zum Referenznachweis miniVIDAS eine gute Korrelation, wohingegen der Turbiquant® D-Dimer Nachweis nur eine mäßige Korrelation aufwies. Bei beiden Testnachweisen fanden sich systematische Fehler und sowohl in der Passing-Bablok Regression als auch im Bland-Altman's Test wurde eine Äquivalenz der Testmethoden und Referenzmethode abgelehnt. Der Grund dafür ist zum Teil im Fehlen internationaler Standards zur D-Dimer Bestimmung zu suchen. Bezüglich der diagnostischen Aussagekraft wies der NycoCard® D-Dimer Nachweis ein gutes Ergebnis auf. Beim Turbiquant® D-Dimer Nachweis zeigte sich eine mangelhafte diagnostische Aussagekraft. Die Ergebnisse des NycoCard® D-Dimer sind mit denen anderer Studien vergleichbar. Somit ist der NycoCard® D-Dimer Nachweis für den klinischen Einsatz zu empfehlen. Im Gegensatz dazu kann eine Empfehlung für den Turbiquant® D-Dimer Nachweis nicht ausgesprochen werden.

Summary

Since the development of the first teststrip for urine glucose in the 40's a lot of different point-of-care systems arose which meanwhile cover large fields of clinical diagnostics. These systems do not only gain importance in guidance and therapy of chronic diseases, but also in routine testing of laboratory standard parameters in practice.

However the decisive question is whether accuracy and sensitivity of the modern mobile assays is sufficiently equivalent to the standard laboratory assay.

Aim of this study was the testing of selected assays by means of different parameters with regard to accuracy and equivalency of the results in reference to the standard laboratory method.

There were compared to the standard laboratory method: on the field of HbA_{1c} diagnostic the system NycoCard[®] HbA_{1c} in combination with the NycoCard[®] Reader II by the PROGEN BIOTECHNIK GMBH; on the field of CRP diagnostic the NycoCard[®] CRP Assay in combination with the NycoCard[®] Reader II by the PROGEN BIOTECHNIK GMBH and the Micros[®] CRP Assay by ABX DIAGNOSTICS. On the field of d-dimer testing there have been compared to the standard laboratory method the NycoCard[®] D-Dimer assay in combination with the NycoCard[®] Reader II by the PROGEN BIOTECHNIK GMBH and the Turbiquant[®] D-Dimer assay by DADE BEHRING.

On the field of HbA_{1c} testing the NycoCard[®] HbA_{1c} assay showed good correlation in reference to the Variant II assay. There was no systematical bias found. In regard to its evidence as diagnostic test it also showed a good result. Compared to other studies this result can be rated as very good. This assay is recommendable above all for clinical use in internal medicine, pediatrics and obstetrics both in outpatient and inpatient clinics.

The tested CRP assays NycoCard[®] CRP and Micros[®] CRP showed both excellent correlation compared to the reference method Tina-quant[®] CRP/ Hitachi 917. The testing on systematical bias was in both negative and the Passing-Bablok-Regression and Bland-Altman's Test showed equivalence of both test assays and reference

assay. Compared to other studies this results are very good. Therefore the tested assays NycoCard[®] CRP and Micros[®] CRP are very recommendable for clinical use, which is above all conceivable in practice, pediatrics as well as in emergency medicine and intensive care units.

On the field of d-dimer testing the NycoCard[®] D-Dimer assay showed good correlation in reference to the miniVIDAS assay, whereas the Turbiquant[®] D-Dimer assay showed only moderate correlation. In both test assays systematical bias was found and Passing-Bablok-Regression as well as Bland-Altman's Test refused equivalence of both testmethods and referencemethod. In part the reason for this is a leak of international standards for d-dimer testing. Regarding to its evidence as diagnostical test the NycoCard[®] D-Dimer showed a good result. The Turbiquant[®] D-Dimer assay showed bad diagnostical evidence. The results of the NycoCard[®] D-Dimer assay are comparable to other studies and therefore it is recommendable for clinical use. In contrast to this recommendation of Turbiquant[®] D-Dimer is not possible.

7 Literaturverzeichnis

1. Ackermann, H.:
Bias. für Windows # 7.07-07/2003,
epsilon-Verlag GbR 1989-2003

2. Agrawal, A., Samols, D., Kushner, I.:
Transcription factor c-Rel enhances C-reactive protein expression by
facilitating the binding of c/EBPbeta to the promotor.
Mol Immunol 2003 Oct; 40(6):373-80

3. Anderson, D.R., Wells, P.S., Stiell, I., MacLeod, B., Simms, M., Gray, L.,
Robinson, J.S., Bormanis, J., Mitchell, M., Leandrowski, B., Flowerdew,
G.:
Management of patients with suspected deep vein thrombosis in the
emergency department : combining use of a clinical diagnosis model with
D-Dimer testing.
J Emerg Med 2000 Oct; 19(3):225-30

4. Ationu, A.:
Carbamylation and glycosylation of haemoglobin in vitro: effects of cyanate
and glucose.
Med Lab Sci 1992 Mar; 49(1):34-7

5. Balion, C.M., Draisey, T.F., Thibert, R.J.:
Carbamylated hemoglobin and carbamylated plasma protein in
hemodialyzed patients.
Kidney Int 1998 Feb; 53(2):488-95

6. Bayer:
Bayer Diagnostics Innovation in Diabetes Management;
www.bayerdiag.com 2000

7. Beer, J.H., Haeberli, A., Vogt, A., Woodtli, K., Henkel, E., Furrer, T., Fey,
M.F.:
Coagulation markers predict survival in cancer patients.
Thromb Haemost 2002 Nov; 88(5):745-9

8. Beller, F.K., Kyank, H.:
Erkrankungen während der Schwangerschaft.
5., neubearbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1990

9. Benoist, J.-F., Orbach, D., Biou, D.:
False increase in C-reactive protein attributable to heterophilic antibodies in
two renal transplant patients treated with rabbit antilymphocyte globulin.
Clin Chem 1998;44(9):1980-1985

10. Blincko, S., Edwards, R.:
Non-separation assay for glycohemoglobin.
Clin Chem 1998;44:1302-1308
11. Bova, C., Greco, F., Ferrari, A., Serafini, O., Nicoletti, M., Garofano, R., Misuraca, G, Bisignani, G., Plastina, F., Pellegrini, A.:
[The usefulness of the association of clinical probability, rapid plasma measurement of D-dimer, compression echography of the lower limbs and echocardiography in the diagnosis of acute pulmonary embolism].
Ital Heart J 2000 Jan; 1(Suppl):116-21
12. Brunnekreeft, J.W., Eidhof, H.H.:
Improved rapid procedure for simultaneous determination of hemoglobins A1a, A1b, A1c, F, C and S, with indication for acetylation or carbamylation by cation-exchange liquid chromatography.
Clin Chem, 39:2514-2518; 1993
13. Buccheri, G., Torchio, P., Ferrigno, D.:
Plasma levels of D-dimer in lung carcinoma: clinical and prognostic significance.
Cancer 2003 Jun 15; 97(12):3044-52
14. Bundesärztekammer:
Richtlinie zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen ; gemäß Beschluss des Vorstandes der Bundesärztekammer vom 28.08.2001
www.bundesaerztekammer.de
15. Cahill, M., Wallace, D., Travers, S., Lipinski, H., Aldington, S., Costigan, C., Mooney, D.:
Detection and prevalence of early diabetic retinopathy in juvenile diabetics with diabetes for 10 years or more.
Eye 2000 Dec;14(Pt6):847-50
16. Chwals, W.J., Fernandez, M.E., Jamie, A.C., Charles, B.J., Rushing, J.T.:
Detection of postoperative sepsis in infants with the use of metabolic stress monitoring.
Archiv of Surgery 1994 Apr; 129(4):437-42
17. Collinson, P.O.:
The need for a point of care testing: an evidence-based appraisal.
Scand J Clin Lab Invest Suppl 1999; 230:67-73
18. Cornuz, J., Ghali, W.A., Hayoz, D., Stoianov, R., Depairon, M., Yersin, B.:
Clinical prediction of deep venous thrombosis using two risk assessment methods in combination with rapid quantitative D-Dimer testing.
Am J Med 2002 Feb 15;112(3):198-203

19. Coss, B.J., Jefferson, L.S., Stone-McCord, S., Ou, C.N., Watrin, C., Sachdeva, R., Copeland, K.C.:
Evaluation of real-time blood glucose monitor in children with diabetic ketoacidosis.
Diabetes Res Clin Pract 1999 Jun ;44(3):175-81
20. Dade Behring Marburg GmbH:
Turbiquant[®] D-Dimer.
Ausgabe September 1999, Marburg 1999
21. Dahler-Eriksen, B.S., Lassen, J.F., Petersen, P.H., Lund, E.D., Lauritzen, T., Brandslund, I.:
Evaluation of near-patient test for C-reactive protein used in daily routine in primary healthcare by use of difference plots.
Clin Chem 1997;43(11):2064-2075
22. Dahler-Eriksen, B.S., Lauritzen, T., Lassen, J.F., Lund, E.D., Brandslund, I.:
Near-Patient Test for C-Reactive Protein in General Practice: Assessment of Clinical, Organizational, and Economic Outcomes.
Clin Chem 1999;45:478-485
23. Da Silva, O., Ohlsson, A., Kenyon, C.:
Accuracy of leucocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review.
Pediatr Infect Dis J 1995 May; 14(5):362-6
24. Dempfle, C., Schraml, M., Besenthal, I., Hansen, R., Gehrke, J., Korte, W., Risch, M., Quehenberger, P., Handler, S., Minar, E., Schulz, I., Zerback, R.:
Multicentre evaluation of a new point-of-care test for the quantitative determination of D-dimer.
Clin Chim Acta 2001 May; 307(1-2):211-8
25. Dempfle, C.E., Zips, S., Ergul, H., Heene, D.L., Fibrin Assay Comparative Trial study group:
The Fibrin Assay Comparison Trial (FACT): evaluation of 23 quantitative D-dimer assays as basis for the development of D-dimer calibrators. FACT study group.
Thromb Haemost 2001 Apr;85(4):671-8
26. Di Napoli, M., Papa, F., Bocola, V.:
Prognostic influence of increased C-reactive protein and fibrinogen levels in ischemic stroke.
Stroke 2001 Jan;32(1):133-8

27. Di Serio, F., Antonelli, G., Trerotoli, P., Tampoia, M., Matarrese, A., Pansins, N.:
Appropriateness of point-of-care testing (POCT) in an emergency department.
Clin Chim Acta 2003 Jul 15;333(2):185-9
28. Dörner, K.:
Klinische Chemie und Hämatologie;
3.; überarbeitete und ergänzte Auflage; Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1999
29. Dryjski, M., O'Brien-Irr, M.S., Harris, L.M., Hassett, J., Janicke, D.:
Evaluation of a screening protocol to exclude the diagnosis of deep venous thrombosis among emergency department patients.
J Vasc Surg 2001 Dec; 34(6):1010-5
30. Du Clos, T.W., Zlock, L.T., Rubin, R.L. :
Analysis of the Binding of C-Reactive Protein to Histones and Chromatin.
J Immun 1988;141:4266-4270, No.12, December 15
31. Dunne, F., Brydon, P., Smith, K., Gee, H. :
Pregnancy in women with Type 2 diabetes: 12 years outcome data 1990-2002.
Diabet Med 2003 Sep; 20(9):734-8
32. Ehl, S., Gering, B., Bartmann, P., Hogel, J., Pohlandt, F.:
C-reactive protein is a useful marker for guiding duration of antibiotic therapy in suspected neonatal bacterial infection.
Pediatrics 1997 Feb;99(2):216-21
33. Erlandsen, E.J., Randers, E.:
Reference interval for serum C-reactive protein in healthy blood donors using the Dade Behring N Latex CRP mono assay.
Scan J Clin Lab Invest 2000; 60: 37-44
34. Evers, I.M., de Valk, H.W., Mol, B.W., ter Braak, E.W., Visser, G.H.:
Macrosomia despite good glycaemic control in Type I diabetic pregnancy; results of a nationwide study in The Netherlands.
Diabetologia 2002 Nov; 45(11):1284-9. Epub 2002 Sep 25
35. Ferrigno, D., Buccheri, G., Ricca, I.:
Prognostic significance of blood coagulation tests in lung cancer.
Eur Respir J 2001 Apr; 17(4):667-73
36. Fitch, J.C.; Mirto, G.P.; Geary, K.L.; Byrne, D.W.; Hines, R.L.:
Point-of-care and standard laboratory coagulation testing during cardiovascular surgery: balancing reliability and timeliness.
J Clin Monit Comput. 1999 May;15(3-4):197-204

37. Galloway, M.J., Woods, R.S., Nicholson, S.L., Foggin, J.J., Elliott, L.:
An audit of waiting times in a haematology clinic before and after the
introduction of point-of-care testing.
Clin Lab Haematol 1999 Jun; 21(3):201-5
38. Gogstad, G.O., Dale, S., Brosstad, F., Brandsnes, O., Holtlund, J., Mork, E.,
Gärtner, E., Borch, S.M.:
Assay of D-Dimer Based on Immunofiltration and Staining with Gold
Colloids.
Clin Chem 1993;39:2070-2076
39. Gomes, M.P., Deitcher, S.R.:
Diagnosis of venous thrombembolic disease in cancer patients.
Oncology (Huntingt) 2003 Jan; 17(1): 126-35, 139 discussion 139-44
40. Gould, B.J., Hall, P.M., Cook, J.G.:
Measurement of glycosylated hemoglobins using an affinity
chromatography method.
Clin Chim Acta 1982 Oct 13;125(1):41-8
41. Gronroos, J.M., Forsstrom, J.J., Irjala, K., Nevalainen, T.J.:
Phospholipase A2, C-reactive protein, and white blood cell count in the
diagnosis of acute appendicitis.
Clin Chem 1994;40:1757-1760
42. Hamwi, A., Schweiger, C.R., Veitl, M., Schmid, R.:
Quantitative measurement of HbA1c by an immunoturbidimetric assay
compared to standard HPLC method.
Am J Clin Pathol 1995 Jul; 104(1):89-95
43. Hasnike, Y., Nakanishi, T., Maeda, K., Tanaka, T., Inoue, T., Takamitsu,
Y.:
Carbamylated hemoglobin as a therapeutic merker in hemodialysis.
Nephron 2002 Jun; 91(2):228-34
44. Hassett, A.C.:
D-dimer Testing and Acute Venous Thromboembolism.
Homepage of the Institute For Transfusion Medicine; <http://www.itxm.org>;
Feb 2000
45. Hawkins, R.C.:
Comparison of four point-of-care HbA1c analytical systems against central
laboratory analysis.
Singapore Med J. 2003 jan;44(1):8-11

46. Henriksen, M., Nystrom, L., Blohme, G., Ostman, J., Kullberg, C., Svensson, M., Scholin, A., Arnqvist, H.J., Bjork, E., Bolinder, J., Eriksson, J.W., Sundkvist, G.:
The incidence of retinopathy 10 years after diagnosis in young adult people with diabetes: results from the nationwide population-based Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS).
Diabetes Care 2003 Feb;26(2):349-54
47. Herold, G.:
Innere Medizin – Eine vorlesungsorientierte Darstellung,
Köln, 2003
48. Harvey, M.A.:
Point-of-care laboratory testing in critical care.
Am J Crit Care 1999 Mar;8(2):72-83; quiz 84-5. Review.
49. Höfler, D., Shah, P.:
C-reaktives Protein – die diagnostische Reichweite;
Georg Thieme Verlag; Stuttgart, 1997
50. Houbouyan-Reveillard, L.L., Mihoubi, A., Houdijk, W.P., Qanadli, S., Joseph, T., Courret, J.P., Page, Goguel, A.F.:
Preliminary evaluation of two new rapid immunometric D-Dimer assays in patients with clinically suspected venous thromboembolism (VTE).
Thromb Haemost 2000 Nov; 84(5):770-4
51. Husebekk, A., Hansson, L.-O.:
C-reaktives Protein in Klinik und Praxis;
1. deutsche Auflage; Axis –Shield PoC AS; Oslo, 2000
52. Hutchinson, W.L., Koenig, W., Fröhlich, M., Sund, M., Lowe, G.D.O., Pepys, M.B.:
Immunometric Assay of Circulating C-Reactive Protein: Age-related Values in the Adult General Population.
Clin Chem 2000 ;46(7):934-938
53. James, K., Baum, L., Adamowski, C., Gewurz, H. :
C-Reactive Protein Antigenicity on the Surface of Human Lymphocytes.
J Immun 1983; Vol. 131, No.6, December
54. Jesudason, D.R., Dunstan, K., Leong, D., Wittert, G.A.:
Macrovascular risk and diagnostic criteria for type 2 diabetes: implications for the use of FPG and HbA1(c) for cost-effective screening.
Diabetes Care 2003 Feb; 26(2):485-90

55. Jiao, Y., Okumiya, T., Saibara, T., Park, K., Sasaki, M.:
Abnormally decreased HbA1c can be assessed with erythrocyte creatine in patients with a shortened erythrocyte age.
Diabetes Care 1998;21(10):1732-5
56. Junge, M.:
Wilcoxon's Signed-Rank Distribution.
www.geocities.com/junge_m
57. Kearon, C., Ginsberg, J.S., Douketis, J., Crowther, M., Brill-Edwards, P., Weitz, J.I., Hirsh, J.:
Management of suspected deep venous thrombosis in outpatients by using clinical assessment and D-Dimer testing.
Ann Intern Med 2001 Jul 17; 135(2):108-11
58. Khaira, H.S., Mann, J.:
Plasma D-Dimer measurement in patients with suspected DVT – a means of avoiding unnecessary venography.
Eur J Vasc Endovasc Surg 1998 Mar; 15(3):235-8
59. Kline, J.A., Nelson, R.D., Jackson, R.E., Courtney, D.M.:
Criteria for the safe use of D-Dimer testing in emergency department patients with suspected pulmonary embolism: a multicenter US study.
Ann Emerg Med 2002 Feb; 39(2):144-52
60. Kovilam, O., Khoury, J., Miodovnik, M., Chames, M., Spinnoto, J., Sibai, B.:
Spontaneous preterm delivery in type 1 diabetic pregnancy: the role of glycemic control.
J Matern Fetal Neonatal Med 2002 Apr; 11(4):245-8
61. Krebs, J.D., Robinson, G.M., Smith, R.B., Toomath, R.J.:
Follow up testing of hyperglycaemia during hospital admission: combined use of fasting plasma glucose and HbA1c.
N Z Med J 2000 Sep 8; 113(1117):379-81
62. Kuukasjarvi, P., Salenius, J.P., Riekkinen, H.:
Prognostic value of preoperative C-reactive protein concentration and white cell count in acute extremity ischaemia.
Eur J Surg 1995 May;161(5):335-9
63. Kushner, I.:
Acute phase proteins.
UpToDate, Vol.9 No.3; 2001

64. Lee-Lewandrowski, E.; Corboy, D.; Lewandrowski, K.; Sinclair, J., Mc Dermot, S.; Benzer, TI.:
Implementation of a point-of-care satellite laboratory in the emergency department of an academic medical center. Impact on test turnaround time and patient emergency department length of stay.
Arch Pathol Lab Med. 2003 Apr;127(4):456-60
65. Liebl, A., Neiss, A., Spannheimer, A., Reitberger, U., Wagner, T., Gortz, A.:
[Costs of type 2 diabetes in Germany. Results of the CODE-2 study.]
Dtsch Med Wochenschr 2001 May 18;126(20):585-9
66. Macy, E.M., Hayes, T.E., Tracy, R.P. :
Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects : implications for reference intervals and epidemiological applications.
Clin Chem 1997;43(1):52-58
67. Martina, W.V., Martijn, E.G., van der Molen, M., Schermer, J.G., Muskiet, F.A.:
Beta N-terminal glycohemoglobins in subjects with common hemoglobinopathies: relation with fructosamine and mean erythrocyte age.
Clin Chem, 39(11):2259-2265; 1993
68. Mayer, W., Hirschwehr, R., Hippmann, G., Odpadlik, H., Bayer, P., Partsch, H.:
Whole-blood immunoassay (SimpliRED) versus plasma immunoassay (Nycocard) for the diagnosis of clinically suspected deep vein thrombosis.
Vasa 1997 May; 26(2):97-101
69. McCulloch, D.K.:
Estimation of blood glucose control in diabetes mellitus.
UpToDate; Vol.9, No3; 2001
70. Meier-Ewert, H.K., Ridker, P.M., Rifai, N., Price, N., Dinges, D.F., Mullington, J.M.:
Absence of Diurnal Variation of C-Reactive Protein Concentrations in Healthy Human Subjects.
Clin Chem 2001;47(3):426-430
71. Metus, P., Ruzzante, N., Bonvicini, P., Meneghetti, M., Zaninotto, M., Plebani, M.:
Immunoturbidimetric assay of glycated hemoglobin.
J Clin Lab Anal 1999; 13(1):5-8

72. Michiels, J.J., Kasbergen, H., Oudega, R., van der Graaf, F., de Maeseneer, M., van der Planken, , Schroyens, W.:
Exclusion and diagnosis of deep vein thrombosis in outpatients by sequential noninvasive tools.
Int Angiol 2002 Mar; 21(1):9-19
73. Mogensen, C.E.:
Renoprotection in diabetes. With special reference to insulin-dependent patients.
Schw Med Wochenschrift, 1995 Dec 26;125(51-52):2471-8
74. Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Shibutani, Y., Harano, T., Takahashi, S., Hada, T.:
Abnormal haemoglobins, Hb Takamatsu and Hb G-Szuhu, detected during the analysis of glycated haemoglobin (HbA1c) by high performance liquid chromatography.
J Clin Pathol 2000 Nov;53(11):854-7
75. Müller, F., Seifert, O., von Kress, H.:
Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik;
71. völlig neu bearbeitete Auflage; München: Bergmann; New York; Heidelberg; Berlin; Tokyo: Springer; 1985
76. Murray, R, Leroux, M., Sabga, E., Palatnick, W., Ludwig, L.:
Effect of point of care testing on length of stay in an adult emergency department.
J Emerg Med 1999 Sep-Oct; 17(5):811-4
77. Nuttall, F.Q.:
Comparison of Percent Total GHb With Percent HbA_{1c} in People With and Without Known Diabetes;
Diabetes Care 21:1475-1480;1998
78. Nycomed Amersham:
Evaluation of the NycoCard[®] HbA1c test system at the Department of Clinical Chemistry, Malmo, Sweden;
Product Manual NycoCard[®] HbA1c, Edition June 1998
79. Pittet, J.L., de Moerloose, P., Reber, G., Durand, C., Villard, C., Piga, N., Rolland, D., Comby, S., Dupuy, G.:
VIDAS D-dimer: fast quantitative ELISA for measuring D-dimer in plasma.
Clin Chem 1996;42:410-415
80. Pschyrembel:
Klinisches Wörterbuch,
257., neu bearbeitete Auflage, Berlin; New York: de Gruyter, 1994

81. Quick, G., Eisenberg, P.:
Bedside measurement of D-dimer in the identification of bacteremia in the emergency department.
J Emerg Med 2000 Oct; 19(3):217-23
82. Roberts, W.L., Sedrick, R., Moulton, L., Spencer, A., Rifai, N.:
Evaluation of Four Automated High-Sensitivity C-Reactive Protein Methods: Implication for Clinical and Epidemiological Applications.
Clin Chem 2000;46(4):461-468
83. Roberts, W.L., Schwarz, E.L., Ayanian, S., Rifai, N. :
Performance characteristics of a point of care C-reactive protein assay.
Clin Chim Acta 2001 Dec;314(1-2):255-9
84. Rose, A.M., Tougate, C., Valdes, R. Jr.:
A hemoglobin A1c immunoassay method not affected by carbamylated hemoglobin.
Ann Clin Lab Sci 1995 Jan-Feb; 25(1):13-9
85. Schnedl, W.J., Krause, R., Halwachs-Baumann, G., Trinker, M., Lipp, R.W., Krejs, G.J.:
Evaluation of HbA_{1c} Determination Methods in Patients With Hemoglobinopathies;
Diabetes Care 23:339-344; 2000
86. Schofield, K.P., Voulgari, F., Gozzard, D.I., Leyland, M.J., Beeching, N.J., Stuart, J.:
C-reactive protein concentration as a guide to antibiotic therapy in acute leukaemia.
J Clin Pathol 1982;35(8):866-869
87. Schwartz, M.W., Schifreen, R.s., Gorman, E., Tuhy, P.M., Bienvenu, J., Warkentin, D.L.:
Development and performance of a fully automated method for assay of C-reactive protein in the aca discrete clinical analyser.
Clin Chem 1988;34:1646-1649
88. Seamark, D.A.; Backhouse, S.N., Powell, R.:
Field-testing and validation in a primary care setting of a point-of-care test for C-reactive protein.
Ann Clin Biochem 2003 Mar; 40(Pt2):178-80
89. Siegenthaler, W.:
Klinische Pathophysiologie,
8., neu bearbeitete Auflage, Stuttgart; New York: Thieme, 2001

90. Stettler, Ch., Mueller, B., Diem, P.:
Was Sie schon immer über HbA1c wissen wollten.
Schweizerische Medizinische Wochenschrift 2000;130:993-1005
91. Stevenson, T.:
Glycosal: the first rapid, point-of-care test for the determination of hemoglobin A1c in patients with diabetes.
Diabetes Technol Ther 1999 Winter; 1(4):425-31
92. Stey, C., Steurer, J., Fehr, J.:
[Comparison of a D-Dimer rapid-test with a plasma-immunoassay for the diagnosis of venous thrombosis or pulmonary embolism in a medical emergency unit].
Schweiz Rundsch Med Prax 1999 Mar 11; 88(11):463-70
93. Stivers, C.R., Baddam, S.R., Clark, A.L., Ammirati, E.B., Irvin, B.R., Blatt, J.M. :
A miniaturized self-contained single-use disposable quantitative test for hemoglobin A1c in blood at the point of care.
Diabetes Technol Ther 2000 Winter; 2(4):517-26
94. Suhonen, L., Stenman, U.H., Koivisto, V., Teramo, K.:
Correlation of HbA1c, glycated serum proteins and albumin, and fructosamin with the 24-h glucose profile of insulin-dependent pregnant diabetics.
Clin Chem, 35(6):922-925, 1989
95. Tejani, N.R., Chonmaitree, T., Rassin, D.K., Howie, V.M., Owen, M.J., Goldman, A.S.:
Use of C-reactive protein in differentiation between acute bacterial and viral otitis media.
Pediatrics 1995; 95(5):664-669;
96. Tarkkinen, P., Palenius, T., Lovgren, T.:
Ultrarapid, ultrasensitive one-step kinetic immunoassay for C-reactive protein (CRP) in whole blood samples: measurement of the entire CRP concentration range with a single sample dilution.
Clin Chem 2002 Feb;48(2):269-77
97. Thaler, L.M., Ziemer, D.C., Gallina, D.L., Cook, C.B., Dunbar, V.G., Phillips, L.S., El-Kebbi, I.M.:
Diabetes in Urban African-Americans. XVII. Availability of Rapid HbA1c Measurements Enhances Clinical Decision Making.
Diabetes Care 22:1415-1421, 1999

98. Thomas, L.:
Labor und Diagnose; Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die
medizinische Diagnostik;
5. Auflage; Th-Books Verlagsgesellschaft mbH; Frankfurt/Main, 1998
99. Turpeinen, U., Karjalainen, U., Stenman, U.H.:
Three assays for glycohemoglobin compared;
Clin Chem 1995; 41:191-195
100. Unkila-Kallio, L., Kallio, M.J., Eskola, J., Peltola, H.:
Serum C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, and white blood
cell count in acute hematogenous osteomyelitis of children.
Pediatrics 1994; 93(1):59-62
101. Urdal, P., Borch, S.M., Landaas, S., Krutnes, M.B., Gogstad, G.O.,
Hjortdahl, P.:
Rapid immunometric measurement of C-reactive protein in whole blood.
Clin Chem 1992 Apr;38(4):580-4
102. Van der Graaf, F., van den Borne, H., van der Kolk, M., de Wild, P.J.,
Janssen, G.W.T., van Uum, S.H.M.:
Exclusion of Deep Venous Thrombosis with D-Dimer Testing: Comparison
of 13 D-Dimer Methods in 99 Outpatients Suspected of Deep Venous
Thrombosis Using Venography as Reference Standard.
Thromb Haemost 2000; 83:191-8
103. Van Heyningen, C., Watson, I.D., Morrice, A.E.:
Point-of-Care Testing Outcomes in an Emergency Department.
Clin Chem 1999 ; 45:437-438
104. Vijan, S., Hofer, T.P., Hayward, R.A.:
Estimated benefits of glycemic control in microvascular complications in
type 2 diabetes.
Ann Intern Med 1997 Nov 1;127(9):780-95
105. Vincenzi Jager, A., Franco Maggi Tavares, M.:
Novel Approach for the analysis of glycated hemoglobin using capillary
isoelectric focussing with chemical mobilization.
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003 Mar 5;785(2):285-
92
106. Vora, J.P., Ibrahim, H.A., Bakris, G.L.:
Responding to the challenge of diabetic nephropathy: the historic evolution
of detection, prevention and management.
J Hum Hypertens 2000 Oct; 14(10/11):667-685

107. Wahlander, K., Tengborn, L., Hellstrom, M., Olmarker, A.H., Peterson, L.E., Stigendal, L., Larson, G.:
Comparison of various D-Dimer tests for the diagnosis of deep venous Thrombosis.
Blood Coagul Fibrinolysis 1999 Apr; 10(3):121-6
108. Wassmer, G.:
Biomathematik-Vorlesung X;
Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Epidemiologie;
Universität zu Köln
109. Wells, P.S., Anderson, D.R., Rodger, M., Stiell, I., Dreyer, J.F., Barnes, D., Forgie, M., Kovacs, G., War, Kovacs, M.J.:
Excluding pulmonary embolism at the bedside without diagnostic imaging : management of patients with suspected pulmonary embolism presenting to the emergency department by using a simple clinical model and d-dimer.
Ann Intern Med 2001 Jul 17; 135(2):98-107
110. Weykamp, C.W., Penders, T.J., Muskiet, F.A., van der Slik, W.:
Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determination, as investigated by 102 laboratories using 16 methods.
Clin Chem 39(8):1717-1723;1993
111. Wojtukrewicz, M.Z., Sierko, E., Zacharski, L.R., Zimnoch, L., Kudryk, B., Kisiel, W.:
Tissue factor-dependent coagulation activation and impaired fibrinolysis in situ in gastric cancer.
Semin Thromb Haemost 2993 Jun; 29(3):291-300
112. Wolbink, G.J., Brouwer, M.C., Buysmann, S., ten Berge, I.J.M., Hack, C.E.:
CRP-Mediated Activation of Complement In Vivo .
J Immun 1996;157:473-479
113. Ying, S.C., Gewurz, H., Kinoshita, C.M., Potempa, L.A., Siegel, J.N.:
Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenetic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies.
J Immunol 1989 Jul;143(1):221-8
114. Yue, C.C., Muller-Greven, J., Dailey, P., Lozanski, G., Anderson, V., Macintyre, S.:
Identification of a C-reactive protein binding site in two hepatic carboxylesterases capable of retaining C-reactive protein within the endoplasmatic reticulum.
J Biol Chem 1996 Sep 6; 271(36):22245-50

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Ingeborg Angela Bretschneider

3. Feb. 1978	Geboren als zweites Kind der Eheleute Wolfhard und Angelika Bretschneider geb. Steinhäuser in Immenstadt im Allgäu
Herbst 1984	Einschulung in die Grundschule Ost in Sonthofen
Herbst 1988	Übertritt an das städtische Gymnasium Sonthofen
Juni 1997	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife
1. Juli 1997	Eintritt als Sanitätsoffizieranwärter in die Teilstreitkraft Marine der Deutschen Bundeswehr
Juli/August 1997	Allgemeine militärische Grundausbildung an der Marineunteroffizierschule in Plön
Sept./Okt. 1997	Seemännische Grundausbildung auf dem Segelschulschiff der Deutschen Marine SSS Gorch Fock
Nov./Dez. 1997	Sanitätsoffizierlehrgang an der Sanitätsakademie der Deutschen Bundeswehr in München
Jan.-März 1998	Seekadettenlehrgang und Lehrgang lebensrettende Maßnahmen an der Marineschule in Mürwik
April 1998	Beurlaubung zum Studium der Humanmedizin und Immatrikulation an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main
Bis März 2000	Vorklinisches Studium Durchführung von zwei Monaten Pflegepraktikum im Bundeswehrkrankenhaus Ulm
März 2000	Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
April 2000	Beginn des klinischen Teils des Studiums
SS 2000	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am Gustav Embden –Institut für Biochemie der J.W.G. Universität Frankfurt
März 2001	Ablegen des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

1. Juli 2001	Beförderung zum Leutnant zur See
Apr. 2000 bis Sept. 2002	Durchführung von fünf einmonatigen Famulaturen in den Bereichen: <ul style="list-style-type: none">- Chirurgie am Bundeswehrkrankenhaus in Ulm- Praxis am Standortsanitätszentrum Sonthofen- Anästhesie am Bundeswehrkrankenhaus Ulm- Ärztlicher Notfalldienst am Lindenhofspital in Bern- Anästhesie am Royal Perth Hospital der University of Western Australia
März 2003	Ablegen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
28. April 2003	Beginn des Praktischen Jahres am Krankenhaus Nordwest in Frankfurt/Main mit Belegung des Wahlfaches Anästhesie

Frankfurt am Main, den 17.03.2004

8.2 Danksagung

Ich möchte allen Personen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, meinen Dank aussprechen, insbesondere:

Herrn PD Dr. G.M. Oremek für die Überlassung des Themas zur Bearbeitung, sowie für die wertvollen Ratschläge und Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Ackermann für die Bereitstellung des Statistikprogramms BiAS. 7.07-2003 und die umfassende Beratung.

Den Mitarbeiterinnen des Zentrallabors des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe Universität für die Unterstützung bei der Durchführung der Referenzbestimmungen.

Den Firmen ABX Diagnostics und Dade Behring für die Bereitstellung von Geräten und Material.

8.3 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main eingereichte Dissertation mit dem Titel

„POINT-OF-CARE DIAGNOSTIK

ROUTINEUNTERSUCHUNG AM KRANKENBETT
VERGLEICH MIT NASSCHEMISCHEN VERFAHREN“

im Zentrum der Inneren Medizin

unter Betreuung und Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. G.M. Oremek

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, den 17.03.2004